

State of New York       )  
                              )  
County of the Bronx     )       ss:

## TRANSLATOR'S AFFIDAVIT

I, Ruth Goldstein, a citizen of the United States of America, residing in Ft. Lee, New Jersey, depose and state that:

I am familiar with the English and German languages;

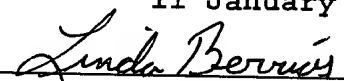
I have read a copy of the German-language document attached hereto, namely Certified Copy of German Patent Application 198 31 609.7 as filed on 14 July 1998 (Priority Document); and

The hereto-attached English-language text is an accurate translation of the above-identified German-language document.

LINDA BERRIOS  
Notary Public State of New York  
No. 01BE5016825  
Qualified in Bronx County  
Commission expires August 23, 2005

  
\_\_\_\_\_  
Ruth Goldstein

Sworn to and subscribed before me  
11 January 2002

  
\_\_\_\_\_  
Notary Public



Forschungszentrum Jülich GmbH

D E S C R I P T I O N

METHOD FOR MICROBIAL PRODUCTION OF AMINO ACIDS OF THE ASPARTATE  
FAMILY AND AGENTS WHICH CAN BE USED IN SAID METHOD

5

The invention relates to a method of microbial production of amino acids of the aspartate family according to claims 1 to 17, to the pyruvate-carboxylase gene according to claims 18 to 23, gene structures according to claim 24, vectors according to claim 25, transformed cells according to claims 26 to 31 as well as to uses according to claims 32 to 37.

10

Amino acids are of considerable economic interest since amino acids have many uses: thus, for example, L-lysine and L-threonine, L-methionine and L-tryptophan are necessary as fodder additives, L-glutamate as a spice additive, L-isoleucine and L-tyrosine in the pharmaceutical industry, L-arginine and L-isoleucine as medicaments or L-glutamate, L-aspartate and L-phenylalanine as starting substances for the synthesis of fine chemicals.

15

20

A preferred method of producing these different amino acids is the biotechnical production by means of microorganisms such that in this manner the biologically-effective and optically-active forms of the respective amino acids are obtained and simple and inexpensive raw materials can be used. As microorganisms, for

example, *Corynebacterium glutamicum* and its derivatives *ssp. Flavum* and *ssp. Lactofermentum* (Liebl et al., Int J System Bacteriol 1991, 41: 255 to 260) in addition to *Escherichia coli* and related bacteria are used.

5                These bacteria normally produce the amino acids but only in amounts required for growth so that no surplus amino acids are formed and can be recovered. This is because in the cells the biosynthesis of amino acids is controlled in many ways. As a consequence, there are already known various processes to increase  
10 the product formation by cutting out the control mechanisms. In these processes, for example, amino acid analogs are introduced to switch off the effective regulation of the biosynthesis. For example, a process is described wherein *Corynebacterium* stems resistant to L-tyrosine analogs and L-phenylalanine analogs have  
15 been used (JP 19037/1976 and 39517/1978). Also processes have been described in which bacteria resistant to L-lysine analogs or L-phenylalanine analogs have been used to suppress the control mechanisms (EP 0 205 849, GB 2 152 509),

20                Furthermore, microorganisms which have been constructed also by recombinant DNA-technique which also obviate regulation of biosynthesis in that the gene which is coded in the no-longer feedback-inhibited key enzyme is cloned and expressed. For example, the recombinant L-lysine-producing bacterium with plasmid-coded feedback-resistant aspartate kinase is known (EP 0 381 527).  
25 In addition, a recombinant L-phenylalanine-producing bacterium with

feedback-resistant prephenate dehydrogenase is described (JP 123475/1986, EP 0 488 424).

In addition, by overexpression of genes which do not code for feedback-sensitive enzymes as amino acid synthesis, increased amino acid yields are obtainable. thus, for example, a lysine formation can be improved by increased synthesis of the dihydrodipicolinate synthesis (EP 0 197 335). ~~Increasingly~~ <sup>Also</sup> by increased synthesis of the threoninedehydratease, improved isoleucine formation is achieved (EP 0 436 886).

Further investigations in increasing amino acid production have been targeted on the improved availability of the cellular primary metabolites of central metabolism. Thus it is known that, by recombinant techniques, over-expression of the transketolase can bring about an improved product formation of L-tryptophan or L-tyrosine or L-phenylalanine (EP 0 600 463). Furthermore, the reduction of the phosphoenolpyruvate-carboxylase activity in Corynebacterium leads to improved formation of aromatic amino acids (EP 0 3331 145) whereas by contrast the increase in the phosphoenolpyruvate-carboxylase activity in Corynebacterium leads to increased separation out of amino acids of the aspartate family (EP 0 358 940).

During the growth and especially under amino acid production conditions, the tricarboxylic acid cycle must continuously and effectively be supplemented with C4 compounds, for example, oxalic acetate to replace intermediate products withdrawn for the amino acid biosynthesis. Until recently it has been

thought that phosphoenolpyruvate-carboxylase was answerable for these so-called anaplerotic functions in *Corynebacterium* (Kinoshita, *Biology of Industrial Micro-organisms* 1985: 115 to 142, Benjamin/Cummings Publishing Company, London; Liebl, *The Prokaryotes II*, 1991 to 1171, Springer Verlag N.Y.; Vallino and Stephanopoulos, *Biotechnol Bioeng* 1993, 41: 633 to 646).

It has, however, now been found that phosphoenolpyruvate-carboxylase-negative mutants grow equally by comparison to the respective starting strains on all media (Peters-Wendisch et al., *FEMS Microbiology Letters* 1993, 112: 269 to 274; Gubler et al., *Appl Microbiol Biotechnol* 1994, 40: 857 to 863). These results indicate that the phosphoenolpyruvate-carboxylase is not essential for the growth and plays no role or only a small role for the anaplerotic reactions. Furthermore the aforementioned results indicate that in *Corynebacterium* another enzyme must be provided which is answerable for the synthesis of oxalacetate which is required for the growth. Recently, indeed, a pyruvate-carboxylase activity has been found in permeablized cells of *Corynebacterium glutamicum* (Peters-Wendisch et al., *Microbiology* 1997, 143: 1095 to 1103). This enzyme is effectively inhibited by AMP, ADP and acetyl coenzyme A and in the presence of lactate as a carbon source is formed in increased quantities. Since one must conclude that this enzyme is answerable primarily for the satisfaction of the tricarboxylic acid cycle of growth, it was to be expected that an increase in the gene expression or the enzymatic activity would

either give rise to no increase in the amino acids belonging to the aspartate or yield only an increase therein.

It has surprisingly been found that an increase in the pyruvate-carboxylase activity by genetic modification of the enzyme and/or by increasing the pyruvate-carboxylase gene expression, the microbial production of amino acids of the aspartate family can be increased. It has been found that especially strains with increased copy numbers of the pyruvate-carboxylase gene can produce about 50% more lysine, 40% more threonine and 150% more homoserine in the culture medium.

The genetic alteration of the pyruvate-carboxylase to increase the enzyme activity is effected preferably by mutation of the endogenous gene. Such mutation can either be achieved by classical methods like, for example, by UV irradiation or by mutation triggering chemicals or targeted by means of gene technological methods like deletion, insertion and/or nucleotide exchange.

The pyruvate-carboxylase gene expression is increased by increasing the gene copy number and/or by reinforcing regulatory factors which positively influence the expression of the gene. Thus a reinforcement of regulatory elements, preferably on the transcription plane can be effected in that especially the transcription signals are increased. This can be effected, for example, by varying the promoter sequence of the promoter preceding the structure gene to enhance its effectiveness or by replacing the promoter completely by more effective promoters. A reinforcement

of the transcription can also be effected by a corresponding influence on a regulator gene associated with the pyruvate-carboxylase gene. This can be achieved, for example, by mutation of a regulatory gene sequence to influence the effectivity of the binding of a regulator protein to the DNA of the pyruvate-carboxylase gene which is regulated so that the transcription is thereby enhanced and thus the gene expression is increased. Furthermore the pyruvate-carboxylase gene can also be associated with a so-called "enhancer" as a regulatory sequence and which by means of an improved interchange between RNA polymerase and DNA also effects an increased pyruvate-carboxylase gene expression. However, a reinforcement of translations is also possible in that, for example, the stability of the m-RNA is improved.

For increasing the gene copy number the pyruvate-carboxylase gene is built into a gene construct or vector. The gene construct contains especially the regulatory sequences associated with the pyruvate-carboxylase gene, preferably those which reinforce the gene expression. For the incorporation of the pyruvate-carboxylase gene in a gene construct, the gene is progressively isolated from a microorganism strain of the *Corynebacterium* variety and is transformed in an amino-acid producing microorganism strain, especially *Corynebacterium* or in *Escherichia coli* or *Serratia marcescens*. For the process of the invention, especially genes from *C. glutamicum* or *C. glutamicum* ssp. *flavum* or *C. glutamicum* ssp. *lactofermentum* are suitable. After isolation of the gene and in the in vitro recombination with

known vectors (see for example Simon et al., Bio/Technology 1983, 1: 784 to 791; Eikmanns et al., Gene 1991, 102: 93 to 98), the transformation is effected in the amino-acid producing strain by electroporation (Liebl et al., FEMS Microbiology Letters 1991, 65: 299 to 304) or conjugation (Schäfer et al., J. Bacteriol 1990, 172: 1663 to 1666). As the host strain preferably such amino-acid producers are used which have been deregulated in the synthesis of the corresponding amino acid and/or show an increased export carrier activity for the corresponding amino acid. Furthermore, such strains are preferred which contain an increased number of such central metabolism metabolites as anticipated in the synthesis of the corresponding amino acid and/or strains which contain a reduced proportion of the central metabolism metabolites which do not participate in the synthesis of the corresponding amino acid, especially metabolites which tolerate competitive reactions; i.e. such strains are preferred with which by synthesis paths competitive with the corresponding amino acid biosynthesis path runs with reduced activity. Thus, especially a *Coryne*-former microorganism strain with reduced citrate synthase activity is suitable as a strain resistant to L-asparaginic-acid- $\beta$ -methylester (AME) is suitable (EP 0 551 614).

After isolation, the pyruvate-carboxylase gene is obtained with nucleotide sequences which code for the amino acid sequence given under SEQ ID No. 2 or their allele variations or the nucleotide sequence of nucleotides 165 to 3587 according to SEQ ID



No. 1 or a substantially identically-effective DNA sequence. The gene further contains a protein promoter of the nucleotide sequence of nucleotides 20 to 109 according to SEQ ID No. 1, a substantially identically effective DNA sequence. Allele variations or  
5 identically effective DNA sequences encompass especially functional derivations which are corresponding nucleotide sequences formed by deletions, insertions and/or substitutions of nucleotides whereby the enzyme activity or function remains or can even be increased. This pyruvate-carboxylase gene is preferably used in the process of  
10 the invention.

The pyruvate-carboxylase gene with or without the preceding promoter or with or without the associated regulator gene can be preceded by and/or followed by one or more DNA sequences so that the gene is contained in a gene structure.

15 The pyruvate-carboxylase gene is preferably preceded by the tac-promoter ( $\text{lacI}^0$ -Gen) with which is associated especially regulatory sequences.

By cloning the pyruvate-carboxylase gene, plasmids are obtained which contain the gene and are suitable for transformation  
20 to an amino acid producer. The cells obtained by transformation which preferably correspond to transformed cells of Corynebacterium, contain the gene in replicatable form, i.e. in additional copies on the chromosome, whereby the gene copies are integrated by recombination at optional sites in the genome and/or  
25 on a plasmid or vector.

### Example

#### 1. Cloning the Pyruvate-Carboxylase Gene of *Corynebacterium Glutamicum*

Starting from conserved regions of all prior known  
5 pyruvate-carboxylase-(pyc-) genes of *Saccharomyces cerevisiae* (J  
Biol Chem 1988, 263: 11493-11497; Mol Gen Genet 1991, 229: 307-  
315), Mensch (Biochem Biophys Acta 1994, 1227: 46-52), Maus (Proc  
Natl Acad Sci, USA 1993, 90: 1766-1770), *Aedes aegypti* (EMBL-  
GeneBank: Accession Nr. L36530) and from *Mycobacterium tuberculosis*  
10 (EMBL-GeneBank: Accession Nr. U00024), PCR primer is synthesized  
(MWG Biotech). The primer corresponds to the bases 810 to 831 and  
1015 to 1037 of the pyc gene from *M. tuberculosis*. With this  
primer, by means of PCR according to the standard method of Innis  
et al (PCR protocols. A Guide to Methods and Applications, 1990,  
15 Academic Press) for nongenerated homologous primer, in a fragment  
of about 200 bp of chromosomal DNA of *C. glutamicum* ATCC 13032 as  
has been described by Eikmanns et al. (Microbiology 1994, 140:  
1817-1828) is isolated following amplification. The size of 200 bp  
corresponds to the expectation for the pyc gene. The PCR product  
20 as described by Sanger et al (Proc Natl Acad Sci USA 1977, 74:  
5463-5467) was sequenced. The sequencing was carried out with  
fluorescence-marked ddNTPs with an automatic DNA sequencing  
apparatus (Applied Biosystems).

Starting from this DNA fragment of *C. glutamicum*, the  
25 following homologous oligonucleotides are produced:

pyc 1 5'- CGTCTTCATCGAAATGAAC-3'

pyc 2    5' -    ACGGTGGTGATCCGGCACT-3'

The oligonucleotide is used as a PCR primer for isolating the probe for the gene of pyruvate-carboxylase (pyc) from *C. glutamicum*. The primer is introduced into a PCR reaction with  
5 chromosomal DNA from *C. glutamicum* and digoxigenine-marked nucleotides. The reaction is carried out in accordance with the instructions of the "PCR DIG Labeling Kits" of the firm Boehringer Mannheim. With this approach, a digoxigenine-marked DNA fragment is amplified which corresponds to the expected size of about 200  
10 bp. The thus produced pyc probe is then used to identify, utilizing Southern-blot-hybridization, A DNA fragment in the chromosomal DNA of *C. glutamicum* on which the pyc gene is localized. For this purpose each 2 to 5 µg of chromosomal DNA from *C. glutamicum* WT is cleaved with the restriction enzyme HindIII,  
15 SphI, SalI, DdraI, EcoRI and BamHI and the obtained DNA fragments are correspondingly separated by size over 16 hours at 20 volts gel-electrophoretically in an 0.8% agarose gel. The DNA fragments found in the agarose gel are denatured by the Southern blot (J Mol Biol 1975, 98: 503-517) and subjected to the vacuum-supported  
20 separation with the VacuGene Blot Apparatus of Pharmacia LKB (Uppsala, Sweden) from the gene matrix transferred onto a nylon membrane (Nytran N13 of Schleicher and Schüll, Dassel, Switzerland), immobilized and the digoxigenine marker detected by means of NBT/X phosphate conversion with alkali phosphatases in  
25 this manner. Following chromosomal fragments hybridized with the

pyc-DNA-probe can be detected: a 17 kb HindIII-fragment, a 6.5 kb SalI fragment and a 1.35 kb EcoRI fragment.

The 17 kb HindIII fragment was isolated and subcloned. For this purpose a cosmid gene bank of chromosomal DNA from *C. glutamicum* in cosmid pH C79 was used which represented the genome of *C. glutamicum* to 99% (Mol Microbiol 1992, 6: 317-326). The *E. coli* strain DH5 $\alpha$  was transformed with this gene bank by means of the CaCl<sub>2</sub> method of Sambrook et al (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press) and plated out to about 300 colonies per LB-agar plate with 50  $\mu$ g/l kanamycin (a total of 5000 colonies). Then the obtained transformed product was transferred on a nytran N13 filter and incubated for 5 minutes for alkali lysis of the cells and denaturing of the DNA on Whatmann paper soaked with 0.5 M NaOH and 1.5 M NaCl. The subsequent neutralization is effected with 1 M Tris/HCl pH 7.5 and 1.5 M NaCl. The subsequent neutralization is effected with 1 M Tris/HCl pH 7.5 and 1.5 M NaCl.

After incubation of the filter in 2 x SSC, the liberated DNA is fixed by UV radiation at 366 nm on the filter. Then the remaining cell fragments are removed by shaking in 3 x SSC, 0.1% SDS at 50°C. The filter in this form is used for the hybridization with a specific pyc probe as described by Southern (J Mol Biol 1975, 98: 503-517).

The 3 transformands were identified from the pyc probe hybridization. From these transformands the cosmid DNA was isolated by means of plasmid proportion in accordance with the

alkali lysis method of Birnboim (Meth Enzymol 1983, 100: 243-255) and then tested by restriction and Southern blot analysis for the presence of the HINDIII fragments. The cosmid pH C79-10 which contains a 40 kb HINDIII transmission completely and was further  
5 analyzed. It showed that also after the restriction with the endonucleosis SalI and EcoRI the same hybridized fragments as in the chromosomal DNA, i.e. a 6.5 kb SalI- fragment and a 1.35 kb EcRI-fragment. The 17 kb HindIII-fragment was isolated by restriction from the cosmid and is ligated in the *E. coli* vector  
10 pUC 18, which is also cleaved with HindIII. A restriction analysis of the fragments in the resulting vector pUC pyc was carried out. The physical mapping of the fragments is shown in FIG. 1.

## 2. Sequencing of the Pyruvate-Carboxylase Gene

In further subcloning steps a 0.85 kb SalI-EcoRI-fragment  
15 was isolated from the plasmid pUC pyc by restriction with corresponding restriction enzymes as a 1.35 kb EcoRI-fragment, a 1.6 kb EcoRI-EcoRI-StuI-fragment as well as a 1.6 kb ClaI-fragment, that overlapped with 0.85 kb SalI-EcoRI-fragment. By ligation the fragments were cloned correspondingly in the restricting vector pUC  
20 18 and then sequenced as described above according to Sanger et al. In (Proc Natl Acad Sci USA 1977, 74: 5463-5467) the nucleotide sequences obtained were analyzed. The program package HUSAR (Release 3.0) of the German zone for cancer research (Heidelberg). The sequence analysis of the fragments gave a continuously open  
25 reading raster of 3576 bp which coded for a protein sequence of

1140 amino acids. Comparison of the protein sequence with the EMBL gene data bank (Heidelberg) gave similarities to all known pyruvate carboxylases. The highest identity (62%) was to the putative pyruvate-carboxylase from *Mycobacterium tuberculosis* (EMBL-  
5 GeneBank: Accession No. U00024). The similarity amounted to 76% when conserved amino acid exchange was followed. A comparison with the pyruvate-carboxylase of other organisms yielded an identity of 46 to 47% identical and 64 to 65% similar amino acids (Gene 1997, 191: 47-50; J Bacteriol 1996, 178: 5960-5970; Proc Natl Acad Sci  
10 USA 1993, 90: 1766-1770; Biochem J 1996, 316: 631-637; EMBL-GenBank: Accession No. L36530; J Biol Chem 1988, 263: 11493-11497; Mol Gen Genet 1991, 229: 307-315). From these results it could be concluded that the cloned fraction base was the gene for the pyruvate-carboxylase from *C. glutamicum*. The nucleotide sequence  
15 of the gene is given under SEQ ID No. 1 and the corresponding amino acid sequence under SEQ ID No. 2.

### 3. Overexpression of the Pyruvate-Carboxylase

For the overexpression of the gene for pyruvate-carboxylase from *C. glutamicum*, the gene was cloned from the  
20 plasmid pUCpyc as the 6.2 kb Sspl-Scal-fragment in the *E. coli glutamicum* swing vector pEK0 (Gene 1991, 102: 93-98) which was cleaved with the restriction endonucleosis EcoRI and PstI. By means of Klenow-polymerase treatment the overhanging ends were ligated to smooth ends by filling the EcoRI or linking PstI and the  
25 linearized vector was ligated with the 6.2 kb Sspl-Scal-fragment.

The resulting construct pEK0pyc was additionally transformed in the *E. coli* strain DH5 $\alpha$ , the plasmid DNA was isolated on the resulting transformant and the correctness of the inserts controlled by restriction. The DNA was then introduced in the strain SP 733 by electroporation (FEMS Microbiol Lett 1989, 65: 299-304).

This strain is a mutant of the restriction negative *C. glutamicum* strain R 127 (Dechema Biotechnology Conference 1990, 4: 323-327, Verlag Chemie) which was obtained by chemical mutagenesis and was characterized in that it cannot be grown on a minimal medium with pyruvate and lactate as single carbon sources (Microbiology 1997, 143: 1095-1103). This phenotype is recognized as a defect in the pyruvate-carboxylase and can be complemented by introducing the pyruvate-carboxylase gene from *C. glutamicum*, i.e. the strain which is carried by the plasmid pEK0pyc and was by contrast to the starting strain able to grow again in the presence of minimal medium with lactate as a single carbon source. This was a verification that the gene was coded for a functional pyruvate-carboxylase

Furthermore, the plasmid pEK0pyc was transformed in the *C. glutamicum* wild type ATCC 13032 by electroporation. The resulting strain WT (pEK0pyc) was investigated by comparison to the wild type ATCC 13032 with respect to its pyruvate-carboxylase activity. The strain was cultured in a complex medium (Luria-Bertani, Molecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) with 0.5% lactate and on minimal medium with 2% lactate or 4% glucose and the pyruvate-carboxylase test was

carried out corresponding to the method as described by Peters-Wendisch et al (Microbiology 1997, 143: 1095-1103). The results of the analysis (Table 1) showed that the pyruvate-carboxylase activity in the pEK0-*pyc*-carrying strain was about 4 times higher than in the starting strain.

#### 4. Increased Accumulation of Lysine by Overexpression of the Pyruvate-Carboxylase Gene in the Strain *C-glutamicum* DG 52-5.

To investigate the effect of the overexpression of the gene for the pyruvate-carboxylase in the lysine-producing strain DG 52-5 (J Gen Microbiol 1988,134: 3221-3229), the expression vector pVWEX1 is used to promote an IPTG-inducible expression. IN this vector, the *pyc* gene was promotorlessly cloned. For that purpose, initially PCR-Primer (Primer 1 = Postion 112 - 133; Primer 2 = Position 373 to 355 in the nucleotide sequence according to SEQ ID No. 1), is synthesized and 261 bp of the promotorless starting region of the pyruvate-carboxylase gene was amplified by means of PCR. The primer was so selected that Primer I enabled a PstI cleavage site and Primer 2 a BamHI cleavage site. After the PCR, the 274 bp PCR product was isolated, ligated to concatemers and then cleaved with the restriction enzymes PstI and BamHI. The restriction product was concentrated by ethanol precipitation and then ligated with the PstI-BamHI cleaved vector pVWEX1. The resulting construct pVWEX1-PCR was tested by restriction. The end region of the *pyc* gene was isolated by RcaI-Klenow-SalI treatment from the vector pEK0*pyc* and ligated in the BamHI-Klenow-SalI during



vector PVWEX1-PCR. The resulting construct pVWEX1pyc was analyzed by restriction mapping. Physical mapping of the plasmid is shown in FIG. 2.

The plasmid was introduced by electroporation in the *C. glutamicum* strain DG 52-5. As a control, the strain DG 52-5 was transformed with the vector pVWEX1 without insert and the L-lysine precipitation of three different transformands were compared. For this purpose (DG 52-5 (pVWEX1pyc) 3,4 and (2xTY; Molecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press with 50  $\mu$ g/I kanamycin) and the respective fermentation medium CGXII (J Bacteriol 1993, 175: 5595-5603) in each case from the preculture was separately inoculated. The medium contained additional kanamycin to maintain the plasmid stable. In each case two parallel tests were run whereby one flask of 200  $\mu$ g IPTG/ml was added while the second flask contained no IPTG. After cultivation for 48 hours at 30°C on a rotation shaker at 120 RPM, the accumulated lysine quantity in the medium was determined. The determination of the amino acid concentration was effected by means of high-pressure liquid chromatography (J Chromat 1983, 266; 471-482).

The results of the fermentation are shown in Table 2 whereby the values given are mean values each from three experiments with different clones. It shows that the overexpression of the pyruvate-carboxylase gene results in a 50% increased accumulation of lysine in the medium. Thus the use of the covered and described gene for the anaplerotic enzyme pyruvate-

carboxylase enables a process of lysine formation to be significantly improved.

5. Increased Accumulation of Threonine and Homoserine by Overexpression of the Pyruvate-Carboxylase Gene in the Strain *C. glutamicum* DM 368-3

Analogously to the experiment in L-lysine formation, the accumulation of threonine in the culture supernatant by overexpression of the gene for pyruvate-carboxylase was also investigated for this purpose, as has been described under point 4, the threonine production strain *C. glutamicum* DM 368-3 (Degussa AG) was transformed with the plasmid pVWEX1pyc with control by the plasmid pVWEX1 and the threonine separation was investigated with each of three different transformands. For this purpose DM 368-3 (pVWEX1) 2 and 3 and DM 368-3 (pVWEX1pyc) 1, 2 and 3 in complex medium (2xTY with 50 µg/l kanamycin) were cultured and the fermentation medium CGXII (J Bacteriol 1993, 175: 5595-5603) in each case was separately inoculated from the preculture. The medium contained additional kanamycin to hold the plasmid stable. Two parallel sets of tests were carried out whereby 200 µg IPTG/ml was added to one flask while the second flask contained no IPTG. After culturing for 48 hours at 30°C on a rotation shaker at 120 RPM, the threonine quantities accumulated in the medium were determined. The determination of the amino acid concentration was effected also by means of high-pressure liquid chromatography (J Chromat 1983, 266: 471-482). The results of the fermentation are

shown in Table 3 whereby the values given are mean values from each of three experiments with different clones. It shows that the overexpression of the pyruvate-carboxylase gene gave about a 40% increase in the threonine concentration in the medium. The use of  
5 the covered and described gene for anaplerotic enzyme pyruvate-carboxylase in a process for L-threonine formation significantly improves the latter.

Furthermore, the amino acid concentration determination shows surprisingly that the strain with the overexpressed pyruvate-  
10 carboxylase gene also yields 150% more homoserine in the medium than the strain with the nonoverexpressed gene. Corresponding results are shown in Table 3. They make clear that in the process according to the invention the threonine like the homoserine can be significantly improved.

## Patent Claims

1           1. A method of microbial production of amino acids of  
2 aspartate and/or glutamate families in which the pyruvate-  
3 carboxylase activity is increased by genetic modification of the  
4 enzyme and/or the pyruvate-carboxylase gene expression of the  
5 corresponding amino-acid-producing micro organism.

1           2. The method of claim 1, characterized in that, by  
2 mutation of the endogenous pyruvate-carboxylase gene an enzyme  
3 with higher pyruvate-carboxylase activity is produced.

1           3. The method of claim 1 or 2, characterized in that,  
2 the gene expression of the pyruvate-carboxylase is increased by  
3 increasing the gene copy number.

1           4. The method according to claim 3, characterized in  
2 that, to increase the gene copy number the pyruvate-carboxylase  
3 gene is incorporated in a gene construct.

1           5. The method according to claim 3, characterized in  
2 that, the gene is incorporated in a gene construct which contains  
3 regulatory gene sequences associated with the pyruvate-  
4 carboxylase gene.

1           6. The method according to claim 4 or 5, characterized  
2 in that, the corresponding amino-acid-producing microorganism is  
3 transformed with the gene-containing gene construct.

1           7. The method according to claim 6, characterized in  
2 that, a microorganism of the species *Corynebacterium* is  
3 transformed with the gene containing the gene construct.

1           8. The method according to claim 6 or 7, characterized  
2 in that, for the transformation a microorganism is used in which  
3 the enzyme participating in the synthesis of the corresponding  
4 amino acid is deregulated and/or wherein an enhanced export  
5 carrier activity is shown for the corresponding amino acid.

1           9. The method according to claim 6 to 8, characterized  
2 in that, for the transformation a microorganism is used which has  
3 a higher proportion of the central metabolism metabolites of the  
4 corresponding amino acid participating in the synthesis.

1           10. The method according to claim 6 to 9,  
2 characterized in that, for the transformation a microorganism is  
3 used in which biosynthesis paths competing with the corresponding  
4 amino acid biosynthesis paths runs with reduced activity.

1           11. The method according to one of the preceding  
2 claims, characterized in that, the pyruvate-carboxylase gene is  
3 isolated from a microorganism strain of the variety  
4 *Corynebacterium*.

1           12. The method according to one of the preceding  
2 claims, characterized in that, the gene expression is increased  
3 by reinforcement of the transcription signal.

1           13. The method according to one of the preceding  
2       claims, characterized in that, the pyruvate-carboxylase gene has  
3       the tac-promoter ahead of the pyruvate-carboxylase gene.

4           14. The method according to claim 13, characterized in  
5       that, the tac-promoter is associated with regulatory sequences.

1           15. The method according to one of the preceding  
2       claims, characterized in that, the pyruvate-carboxylase gene is a  
3       gene with the amino acid sequence given under SEQ ID No. 2 and  
4       its allele variation coding nucleotide sequences.

1           16. The method according to claim 15, characterized in  
2       that, with the pyruvate-carboxylase gene a gene with the  
3       nucleotide sequence of nucleotide 165 to 3587 according to SEQ ID  
4       No. 1 or a substantially identically-effective DNA sequence is  
5       used.

1           17. The method according to one of the preceding  
2       claims for the production of lysine, threonine, homoserine,  
3       glutamate and/or arginine.

1           18. A pyruvate-carboxylase gene coding for the amino  
2 acid sequence given under SEQ ID No. 2 and /or a nucleotide  
3 sequence coding for its allele variations.

1           19. The pyruvate-carboxylase gene according to claim  
2 18 with the nucleotide sequence of nucleotides 165 to 3587  
3 according to SEQ ID No. 1 or a substantially identically-  
4 effective DNA sequence.

1           20. The pyruvate-carboxylase gene according to claim  
2 18 or 19 with a preceding promoter of the nucleotide sequence  
3 from nucleotide 20 to 109 according to SEQ ID No. 1 or a  
4 substantially-identically-effective DNA sequence.

5           21. The pyruvate-carboxylate gene according to claim  
6 18 or 19, with preceding tac-promoter.

7           22. The pyruvate-carboxylase gene according to claim  
8 21 with the regulatory sequence associated with the promoter.



1           23. The pyruvate-carboxylase gene according to one of  
2       claims 18 to 20 with these regulatory gene sequences associated  
3       therewith.

1           24. A gene structure containing a pyruvate-carboxylase  
2       gene according to one of claims 18 to 23.

3           25. A vector containing a pyruvate-carboxylase gene  
4       according to one of claims 18 to 23 or a gene structure according  
5       to claim 24.

1           26. Transformed cells containing in replicatable form  
2       a pyruvate-carboxylase gene according to one of claims 18 to 23  
3       or a gene structure according to claim 24.

1           27. Transformed cells according to claim 26 containing  
2       a vector according to claim 25.

1           28. Transformed cells according to claim 26 or 27,  
2       characterized in that, they belong to the variety  
3       *Corynebacterium*.

1           29. Transformed cells according to one of claims 26 to  
2 28, characterized in that, enzymes which participate in the  
3 synthesis of the corresponding amino acid and/or enzyme which  
4 participate in the export of the corresponding amino acid are  
5 deregulated.

6           30. Transformed cells according to one of claims 26 to  
7 29, characterized in that, they contain an increased proportion  
8 of the central metabolism metabolites participating in the  
9 synthesis of the corresponding amino acid.

1           31. Transformed cells according to one of claims 26 to  
2 30, characterized in that, they contain a reduced proportion of  
3 the central metabolism metabolites which do not participate in  
4 the synthesis of the corresponding amino acid.

1           32. The use of a pyruvate-carboxylase gene for  
2 increasing the production of amino acids of the aspartate and/or  
3 glutamate families by microorganisms.

1           33. The use according to claim 32, characterized in  
2 that, a mutated pyruvate-carboxylase gene which codes for an  
3 enzyme with increase pyruvate-carboxylase activity is used.

1           34. The use according to claim 32 or 33, characterized  
2 in that, the microorganism producing the corresponding amino acid  
3 is transformed with a gene construct that contains a pyruvate-  
4 carboxylase gene.

1           35. The use according to claim 34, characterized in  
2 that, the gene construct additionally contains regulatory gene  
3 sequences.

1           36. The use according to one of claims 32 or 35,  
2 characterized in that, a pyruvate-carboxylase gene from  
3 *Corynebacterium* is used.

1           37. The use according to one of claims 32 or 36,  
2 characterized in that, *Corynebacterium* is used as the amino acid-  
3 producing microorganism.



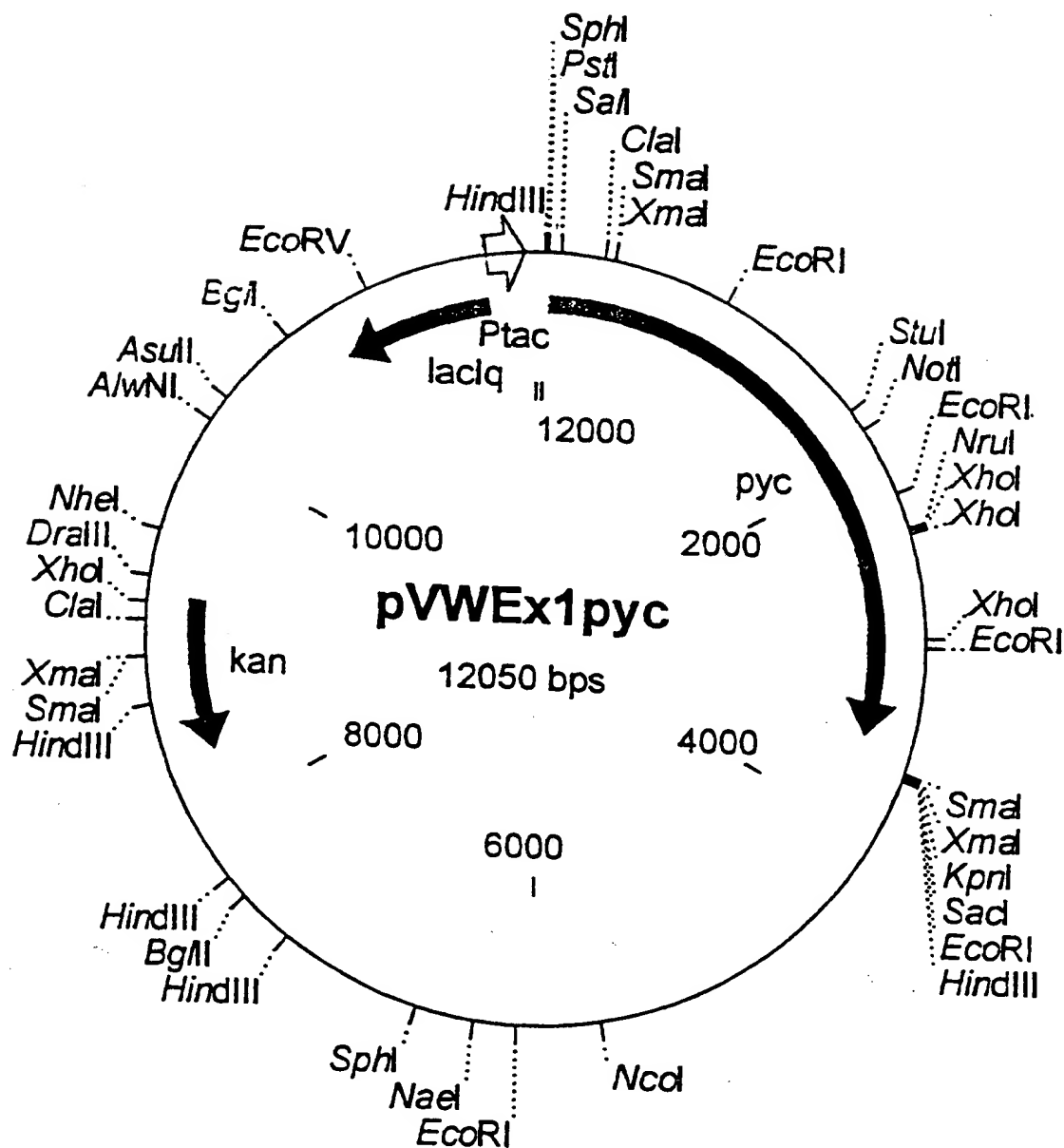


Figure 2

Strain	IPTG [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Pyruvate Carboxylase [nmol min <sup>-1</sup> mg Dry Weight <sup>-1</sup> ]
13032(pEK0pyc)	0	75 $\pm$ 13
ATCC 13032	0	19 $\pm$ 4
DG52-5(pVWEX1pyc)	200	88 $\pm$ 13
	0	11 $\pm$ 2
DG52-5(pVWEX1)	200	5 $\pm$ 2
	0	6 $\pm$ 1
DM368-3(pVWEX1pyc)	200	76 $\pm$ 10
	0	12 $\pm$ 3
DM368-3(pVWEX1)	200	10 $\pm$ 1
	0	11 $\pm$ 2

**Table 1**

Strain	IPTG [ $\mu$ g/ml]	Lysine [mM]
DG52-5(pVWEX1pyc)	200	$35.4 \pm 2.6$
	0	$23.6 \pm 2.9$
DG52-5(pVWEX1)	200	$23.3 \pm 2.9$
	0	$22.1 \pm 4.0$

Table 2

Strain	IPTG [μg/ml]	Threonine [mM]	Homoserine [mM]
DM368-3(pVWEX1pyc)	200	10,2 ± 0,5	14,4 ± 1,2
	0	7,9 ± 1,0	5,6 ± 0,2
DM368-3(pVWEX1)	200	8,0 ± 0,5	5,8 ± 0,7
	0	7,5 ± 0,8	6,1 ± 1,0

Table 3



Strain	IPTG [μg/ml]	Glutamate [mM]
ATCC 13032	200	11 ± 2
ATCC 13032	0	13 ± 2
ATCC 13032(pVWEX1- <i>pyc</i> )	200	67 ± 4
ATCC 13032(pVWEX1- <i>pyc</i> )	0	32 ± 4

Table 4

# SEQUENCE PROTOCOL

## (1) GENERAL DETAILS :

### (i) APPLICANTS

(A) NAME: Forschungszentrum Juelich GmbH  
(B) STREET.: Postfach 1913  
(C) LOCALE: Juelich  
(E) COUNTRY: GERMANY  
(F) ZIP CODE : 52425

(ii) DESIGNATION OF THE INVENTION: Pyruvate Carboxylase

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 2

### (iv) COMPUTER-READABLE FORM :

(A) DATA CATEGORY: floppy disk  
(B) COMPUTER: IBM PC compatible  
(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS  
(D) SOFTWARE: Patent In Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

## (2) DETAILS TO SEQ ID NO: 1:

### (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 3728 Base PAIRS  
(B) TYPE: Nucleotide  
(C) STRAND SHAPE: Single strand  
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) TYPE OF MOLECULES : Genom<sup>e</sup> DNA

### (xi) SEQUENCE DESCRIPTION SEQ ID NO: 1:

CGCAACCGTG CTTGAAGTCG TGCAGGTCAG GGGAGTGTTG CCCGAAAACA TTGAGAGGAA	60
AACAAAAACC GATGTTTGAT TGGGGGAATC GGGGGTTACG ATACTAGGAC GCAGTGACTG	120
CTATCACCT TGGCGGTCTC TTGTTGAAAG GAATAATTAC TCTAGTGTCTG ACTCACACAT	180
CTTCAACGCT TCCAGCATTC AAAAAGATCT TGGTAGCAAA CCGCGGCGAA ATCGCGGTCC	240
GTGCTTTCCG TGCAGCACTC GAAACCGGTG CAGCCACGGT AGCTATTTAC CCCCCTGAAG	300
ATCGGGGATC ATTCCACCGC TCTTTTGCTT CTGAAGCTGT CCGCATTGGT ACCGAAGGCT	360
CACCACTCAA GCGGTACCTG GACATCGATG AAATTATCGG TGCAGCTAAA AAAGTTAAAG	420
CAGATGCCAT TTACCCGGGA TACGGCTTCC TGTCTGAAAA TGCCCAGCTT GCCC GCGAGT	480

GTGCGGAAAA CGGCATTACT TTTATTGGCC CAACCCAGG GGTCTTGAT CTCACCGGTG	540
ATAAGTCTCG CGCGGTAACC GCCGCGAAGA AGGCTGGTCT GCCAGTTTGG GCGGAATCCA	600
CCCCGAGCAA AAACATCGAT GAGATCGTTA AAAGCGCTGA AGGCCAGACT TACCCCATCT	660
TTGTGAAGGC AGTTGCCGGT GGTGGCGGAC GCGGTATGCG TTTTGTGCT TCACCTGATG	720
AGCTTCGCAA ATTAGCAACA GAAGCATCTC GTGAAGCTGA AGCGGCTTTC GGCATGGCG	780
CGGTATATGT CGAACGTGCT GTGATTAACC CTCAGCATAT TGAAGTGCAG ATCCTTGGCG	840
ATCACACTGG AGAAGTTGTA CACCTTTATG AACGTGACTG CTCACTGCAG CGTCGTCACC	900
AAAAAGTTGT CGAAATTGCG CCAGCACAGC ATTTGGATCC AGAACTGCGT GATCGCATTT	960
GTGCGGATGC AGTAAAGTTC TGCCGCTCCA TTGGTTACCA GGGCGCGGGA ACCGTGGAAT	1020
TCTTGGTCGA TGAAAAGGGG AACCAGTCT TCATCGAAAT GAACCCACGT ATCEAGGTTG	1080
AGCACACCGT GACTGAAGAA GTCACCGAGG TGGACCTGGT GAAGGCGCAG ATGCGCTTGG	1140
CTGCTGGTGC AACCTTGAAG GAATTGGGTC TGACCCAAGA TAAGATCAAG ACCCAGGTG	1200
CAGCACTGCA GTGCCGCATC ACCACGGAAG ATCCAAACAA CGGCTTCCGC CCAGATACCG	1260
GAAGTATCAC CGCGTACCGC TCACCAGGCG GAGCTGGCGT TCGTCTTGAC GGTGCAGCTC	1320
AGCTCGGTGG CGAAATCACC GCACACTTTG ACTCCATGCT GGTGAAAATG ACCTGCCGTG	1380
GTTCCGACTT TGAAACTGCT GTTGCTCGTG CACAGCGCGC GTTGGCTGAG TTCACCGTGT	1440
CTGGTGTTGC AACCAACATT GGTTCCTTGC GTGCGTTGCT GCGGGAAGAG GACTTCACTT	1500
CCAAGCGCAT CGCCACCGGA TTCATTGCCG ATCACCAGCA CCTCCTTCAG GCTCCACCTG	1560
CTGATGATGA GCAGGGACGC ATCCTGGATT ACTTGGCAGA TGTACCGTG AACAAAGCTC	1620
ATGGTGTGCG TCCAAAGGAT GTTGACGCTC CTATCGATAA GCTGCCTAAC ATCAAGGATC	1680
TGCCACTGCC ACGCGGTTC CGTGACCGCC TGAAGCAGCT TGGCCAGCC GCGTTTGCTC	1740
GTGATCTCCG TGAGCAGGAC GCACTGGCAG TTAAGTATAC CACCTTCCGC GATGCACACC	1800
AGTCTTTGCT TGCGACCGA GTCCGCTCAT TCGCACTGAA GCCTGCGGCA GAGGCCGTG	1860
CAAAGCTGAC TCCTGAGCTT TTGTCCGTGG AGGCCTGGGG CGGCGCGACC TACGATGTGG	1920
CGATGCGTTT CCTCTTTGAG GATCCGTGGG ACAGGCTCGA CGAGCTGCGC GAGGCGATGC	1980
CGAATGTAAA CATTGAGATG CTGCTTCGCG GCCGCAACAC CGTGGGATAC ACCCGTACC	2040
CAGACTCCGT CTGCCGCGG TTTGTAAAG AAGCTGCCAG CTCCGGCGTG GACATCTTCC	2100

GCATCTTCGA CGCGCTTAAC GACGTCTCCC AGATGCGTCC AGCAATCGAC GCAGTCCTGG	2160
AGACCAACAC CGCGGTAGCC GAGGTGGCTA TGGCTTATTC TGGTGATCTC TCTGATCCAA	2220
ATGAAAAGCT CTACACCCTG GATTACTACC TAAAGATGGC AGAGGAGATC GTCAAGTCTG	2280
GCGCTCACAT CTTGGCCATT AAGGATATGG CTGGTCTGCT TCGCCCAGCT GCGGTAACCA	2340
AGCTGGTCAC CGCACTGCGC CGTGAATTCG ATCTGCCAGT GCACGTGCAC ACCCACGACA	2400
CTGCGGGTGG CCAGCTGGCA ACCTACTTTG CTGCAGCTCA AGCTGGTGCA GATGCTGTTG	2460
ACGGTGCTTC CGCACCCTG TCTGGCACCA CCTCCCAGCC ATCCCTGTCT GCCATTGTTG	2520
CTGCATTGCG GCACACCCGT CGCGATACCG GTTTGAGCCT CGAGGCTGTT TCTGACCTCG	2580
AGCCGTACTG GGAAGCAGTG CGCGGACTGT ACCTGCCATT TGAGTCTGGA ACCCCAGGCC	2640
CAACCGGTCG CGTCTACCGC CACGAAATCC CAGGCGGACA GTTGTCCAAC CTGCGTGCAC	2700
AGGCCACCGC ACTGGGCCTT GCGGATCGTT TCGAACTCAT CGAAGACAAC TACGCAGCCG	2760
TTAATGAGAT GCTGGGACGC CCAACCAAGG TCACCCCATC CTCCAAGGTT GTTGGCGACC	2820
TCGCACTCCA CCTCGTTGGT GCGGGTGTGG ATCCAGCAGA CTTTGCTGCC GATCCACAAA	2880
AGTACGACAT CCCAGACTCT GTCATCGCGT TCCTGCGCGG CGAGCTTGGT AACCCTCCAG	2940
GTGGCTGGCC AGAGCCACTG CGCACCCGCG CACTGGAAGG CCGCTCCGAA GGCAAGGCAC	3000
CTCTGACGGA AGTTCCTGAG GAAGAGCAGG CGCACCTCGA CGCTGATGAT TCCAAGGAAC	3060
GTCGCAATAG CCTCAACCGC CTGCTGTTCC CGAAGCCAAC CGAAGAGTTC CTCGAGCACC	3120
GTCGCCGCTT CGGCAACACC TCTGCGCTGG ATGATCGTGA ATTCTTCTAC GGCCTGGTCG	3180
AAGGCCGCGA GACTTTGATC CGCCTGCCAG ATGTGCGCAC CCCACTGCTT GTTCGCCTGG	3240
ATGCGATCTC TGAGCCAGAC GATAAGGGTA TGCGCAATGT TGTGGCCAAC GTCAACGGCC	3300
AGATCCGCCC AATGCGTGTG CGTGACCGCT CCGTTGAGTC TGTACCGCA ACCGCAGAAA	3360
AGGCAGATTC CTCCAACAAG GGCCATGTTG CTGCACCATT CGCTGGTGTT GTCACCGTGA	3420
CTGTTGCTGA AGGTGATGAG GTCAAGGCTG GAGATGCAST CGCAATCATC GAGGCTATGA	3480
AGATGGAAGC AACAACTACT GCTTCTGTTG ACGGCAAAAT CGATCGCGTT GTGGTTCCTG	3540
CTGCAACGAA GGTGGAAGGT GCGGACTTGA TCGTCGTCGT TTCCTAAACC TTTCTGTAAA	3600
AAGCCCCGCG TCTTCCTCAT GGAGGAGGCG GGGCTTTTTG GGCCAAGATG GGAGATGGGT	3660
GAGTTGGATT TGGTCTGATT CGACACTTTT AAGGGCAGAG ATTTGAAGAT GGAGACCAAG	3720

## (2) DETAILS TOSEQ ID NO: 2:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 1140 Aminosäuren

(B) TYPE: Aminosäure

(C) STRAND SHAPE: single strand

(D) TOPOLOGY: linear

## (ii) TYPE OF MOLECULE: Protein

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 2:

Met Ser Thr His Thr Ser Ser Thr Leu Pro Ala Phe Lys Lys Ile Leu  
1                      5                      10                      15

Val Ala Asn Arg Gly Glu Ile Ala Val Arg Ala Phe Arg Ala Ala Leu  
                    20                      25                      30

Glu Thr Gly Ala Ala Thr Val Ala Ile Tyr Pro Arg Glu Asp Arg Gly  
                    35                      40                      45

Ser Phe His Arg Ser Phe Ala Ser Glu Ala Val Arg Ile Gly Thr Glu  
                    50                      55                      60

Gly Ser Pro Val Lys Ala Tyr Leu Asp Ile Asp Glu Ile Ile Gly Ala  
65                      70                      75                      80

Ala Lys Lys Val Lys Ala Asp Ala Ile Tyr Pro Gly Tyr Gly Phe Leu  
                    85                      90                      95

Ser Glu Asn Ala Gln Leu Ala Arg Glu Cys Ala Glu Asn Gly Ile Thr  
                    100                      105                      110

Phe Ile Gly Pro Thr Pro Glu Val Leu Asp Leu Thr Gly Asp Lys Ser  
                    115                      120                      125

Arg Ala Val Thr Ala Ala Lys Lys Ala Gly Leu Pro Val Leu Ala Glu  
                    130                      135                      140

Ser Thr Pro Ser Lys Asn Ile Asp Glu Ile Val Lys Ser Ala Glu Gly  
145                      150                      155                      160

Gln Thr Tyr Pro Ile Phe Val Lys Ala Val Ala Gly Gly Gly Gly Arg  
                    165                      170                      175

Gly Met Arg Phe Val Ala Ser Pro Asp Glu Leu Arg Lys Leu Ala Thr  
                    180                      185                      190

Glu Ala Ser Arg Glu Ala Glu Ala Ala Phe Gly Asp Gly Ala Val Tyr

195	200	205
Val Glu Arg Ala Val Ile Asn Pro Gln His Ile Glu Val Gln Ile Leu 210 215 220		
Gly Asp His Thr Gly Glu Val Val His Leu Tyr Glu Arg Asp Cys Ser 225 230 235 240		
Leu Gln Arg Arg His Gln Lys Val Val Glu Ile Ala Pro Ala Gln His 245 250 255		
Leu Asp Pro Glu Leu Arg Asp Arg Ile Cys Ala Asp Ala Val Lys Phe 260 265 270		
Cys Arg Ser Ile Gly Tyr Gln Gly Ala Gly Thr Val Glu Phe Leu Val 275 280 285		
Asp Glu Lys Gly Asn His Val Phe Ile Glu Met Asn Pro Arg Ile Gln 290 295 300		
Val Glu His Thr Val Thr Glu Glu Val Thr Glu Val Asp Leu Val Lys 305 310 315 320		
Ala Gln Met Arg Leu Ala Ala Gly Ala Thr Leu Lys Glu Leu Gly Leu 325 330 335		
Thr Gln Asp Lys Ile Lys Thr His Gly Ala Ala Leu Gln Cys Arg Ile 340 345 350		
Thr Thr Glu Asp Pro Asn Asn Gly Phe Arg Pro Asp Thr Gly Thr Ile 355 360 365		
Thr Ala Tyr Arg Ser Pro Gly Gly Ala Gly Val Arg Leu Asp Gly Ala 370 375 380		
Ala Gln Leu Gly Gly Glu Ile Thr Ala His Phe Asp Ser Met Leu Val 385 390 395 400		
Lys Met Thr Cys Arg Gly Ser Asp Phe Glu Thr Ala Val Ala Arg Ala 405 410 415		
Gln Arg Ala Leu Ala Glu Phe Thr Val Ser Gly Val Ala Thr Asn Ile 420 425 430		
Gly Phe Leu Arg Ala Leu Leu Arg Glu Glu Asp Phe Thr Ser Lys Arg 435 440 445		
Ile Ala Thr Gly Phe Ile Ala Asp His Pro His Leu Leu Gln Ala Pro 450 455 460		
Pro Ala Asp Asp Glu Gln Gly Arg Ile Leu Asp Tyr Leu Ala Asp Val 465 470 475 480		
Thr Val Asn Lys Pro His Gly Val Arg Pro Lys Asp Val Ala Ala Pro		

485

490

495

Ile Asp Lys Leu Pro Asn Ile Lys Asp Leu Pro Leu Pro Arg Gly Ser  
 500 505 510  
 Arg Asp Arg Leu Lys Gln Leu Gly Pro Ala Ala Phe Ala Arg Asp Leu  
 515 520 525  
 Arg Glu Gln Asp Ala Leu Ala Val Thr Asp Thr Thr Phe Arg Asp Ala  
 530 535 540  
 His Gln Ser Leu Leu Ala Thr Arg Val Arg Ser Phe Ala Leu Lys Pro  
 545 550 555 560  
 Ala Ala Glu Ala Val Ala Lys Lys Thr Pro Glu Leu Leu Ser Val Glu  
 565 570 575  
 Ala Trp Gly Gly Ala Thr Tyr Asp Val Ala Met Arg Phe Leu Phe Glu  
 580 585 590  
 Asp Pro Trp Asp Arg Leu Asp Glu Leu Arg Glu Ala Met Pro Asn Val  
 595 600 605  
 Asn Ile Gln Met Leu Leu Arg Gly Arg Asn Thr Val Gly Tyr Thr Pro  
 610 615 620  
 Tyr Pro Asp Ser Val Cys Arg Ala Phe Val Lys Glu Ala Ala Ser Ser  
 625 630 635 640  
 Gly Val Asp Ile Phe Arg Ile Phe Asp Ala Leu Asn Asp Val Ser Gln  
 645 650 655  
 Met Arg Pro Ala Ile Asp Ala Val Leu Glu Thr Asn Thr Ala Val Ala  
 660 665 670  
 Glu Val Ala Met Ala Tyr Ser Gly Asp Leu Ser Asp Pro Asn Glu Lys  
 675 680 685  
 Leu Tyr Thr Leu Asp Tyr Tyr Leu Lys Met Ala Glu Glu Ile Val Lys  
 690 695 700  
 Ser Gly Ala His Ile Leu Ala Ile Lys Asp Met Ala Gly Leu Leu Arg  
 705 710 715 720  
 Pro Ala Ala Val Thr Lys Leu Val Thr Ala Leu Arg Arg Glu Phe Asp  
 725 730 735  
 Leu Pro Val His Val His Thr His Asp Thr Ala Gly Gly Gln Leu Ala  
 740 745 750  
 Thr Tyr Phe Ala Ala Ala Gln Ala Gly Ala Asp Ala Val Asp Gly Ala  
 755 760 765  
 Ser Ala Pro Leu Ser Gly Thr Thr Ser Gln Pr Ser Leu Ser Ala Ile

770

775

780

Val Ala Ala Phe Ala His Thr Arg Arg Asp Thr Gly Leu Ser Leu Glu  
785 790 795 800

Ala Val Ser Asp Leu Glu Pro Tyr Trp Glu Ala Val Arg Gly Leu Tyr  
805 810 815

Leu Pro Phe Glu Ser Gly Thr Pro Gly Pro Thr Gly Arg Val Tyr Arg  
820 825 830

His Glu Ile Pro Gly Gly Gln Leu Ser Asn Leu Arg Ala Gln Ala Thr  
835 840 845

Ala Leu Gly Leu Ala Asp Arg Phe Glu Leu Ile Glu Asp Asn Tyr Ala  
850 855 860

Ala Val Asn Glu Met Leu Gly Arg Pro Thr Lys Val Thr Pro Ser Ser  
865 870 875 880

Lys Val Val Gly Asp Leu Ala Leu His Leu Val Gly Ala Gly Val Asp  
885 890 895

Pro Ala Asp Phe Ala Ala Asp Pro Gln Lys Tyr Asp Ile Pro Asp Ser  
900 905 910

Val Ile Ala Phe Leu Arg Gly Glu Leu Gly Asn Pro Pro Gly Gly Trp  
915 920 925

Pro Glu Pro Leu Arg Thr Arg Ala Leu Glu Gly Arg Ser Glu Gly Lys  
930 935 940

Ala Pro Leu Thr Glu Val Pro Glu Glu Glu Gln Ala His Leu Asp Ala  
945 950 955 960

Asp Asp Ser Lys Glu Arg Arg Asn Ser Leu Asn Arg Leu Leu Phe Pro  
965 970 975

Lys Pro Thr Glu Glu Phe Leu Glu His Arg Arg Arg Phe Gly Asn Thr  
980 985 990

Ser Ala Leu Asp Asp Arg Glu Phe Phe Tyr Gly Leu Val Glu Gly Arg  
995 1000 1005

Glu Thr Leu Ile Arg Leu Pro Asp Val Arg Thr Pro Leu Leu Val Arg  
1010 1015 1020

Leu Asp Ala Ile Ser Glu Pro Asp Asp Lys Gly Met Arg Asn Val Val  
1025 1030 1035 1040

Ala Asn Val Asn Gly Gln Ile Arg Pr Met Arg Val Arg Asp Arg Ser  
1045 1050 1055

Val Glu Ser Val Thr Ala Thr Ala Glu Lys Ala Asp Ser Ser Asn Lys



1060

1065

1070

Gly His Val Ala Ala Pro Phe Ala Gly Val Val Thr Val Thr Val Ala  
1075 1080 1085

Glu Gly Asp Glu Val Lys Ala Gly Asp Ala Val Ala Ile Ile Glu Ala  
1090 1095 1100

Met Lys Met Glu Ala Thr Ile Thr Ala Ser Val Asp Gly Lys Ile Asp  
1105 1110 1115 1120

Arg Val Val Val Pro Ala Ala Thr Lys Val Glu Gly Gly Asp Leu Ile  
1125 1130 1135

Val Val Val Ser  
1140

Forschungszentrum Jülich GmbH

METHOD FOR MICROBIAL PRODUCTION OF AMINO ACIDS OF THE ASPARTATE  
AND/OR GLUTAMATE FAMILY AND AGENTS WHICH CAN BE USED  
IN SAID METHOD

Abstract

The present invention relates to a method for microbial production of amino acids of the aspartate and/or glutamate family, wherein the pyruvate-carboxylase activity is increased by genetic modification of the enzyme and/or the pyruvate-carboxylate gene expression of a microorganism producing the corresponding amino acid. Furthermore the present invention relates to a pyruvate-carboxylase gene, as well as further agents which can be used by the method of the invention.

21437

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 198 31 609.7

**Anmeldetag:** 14. Juli 1998

**Anmelder/Inhaber:** Forschungszentrum Jülich GmbH, Jülich/DE.

**Bezeichnung:** Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren der Aspartat- und/oder Glutamatfamilie und im Verfahren einsetzbare Mittel

**Priorität:** 4.10.1997 DE 197 43 894.6

**IPC:** C 12 N, C 07 H, C 12 P

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 1. August 2001  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Jerofsky

## Beschreibung

5

Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren der Aspartat- und/oder Glutamatfamilie und im Verfahren einsetzbare Mittel

---

10

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren der Aspartat- und/oder Glutamatfamilie gemäß den Ansprüchen 1 bis 17, Pyruvat-Carboxylase-Gene nach Anspruch 18 bis 23, Genstrukturen nach Anspruch 24, Vektoren nach Anspruch 25, transformierte Zellen nach Anspruch 26 bis 31 sowie

15 Verwendungen nach Anspruch 32 bis 37.

20

Aminosäuren sind von großem wirtschaftlichen Interesse, wobei die Verwendung von Aminosäuren vielfältig ist: So wird z.B. L-Lysin wie auch L-Threonin, L-Methionin und L-Tryptophan als Futtermittelzusatz benötigt, L-Glutamat als Gewürzzusatz, L-Isoleucin und L-Tyrosin in der pharmazeutischen Industrie, L-Arginin und L-Isoleucin als Medikament oder L-Glutamat, L-Aspartat und L-Phenylalanin als Ausgangssubstanz zur Synthese von Feinchemikalien.

25

Eine bevorzugte Methode zur Herstellung dieser verschiedensten Aminosäuren ist die biotechnologische Herstellung mittels Mikroorganismen; denn auf diese Weise wird direkt die biologisch wirksame und optisch aktive Form der jeweiligen Aminosäure erhalten, und es können einfache und preisgünstige Rohstoffe eingesetzt werden. Als Mikroorganismen werden z.B. *Corynebacterium glutamicum* und seine Verwandten *ssp. flavum* und *ssp. lactofermentum* (Liebl et al., Int J System Bacteriol 1991, 41: 255 bis 260) wie auch *Escherichia coli* und verwandte Bakterien eingesetzt.

30

Diese Bakterien produzieren die Aminosäuren normalerweise aber nur in der zum Wachstum benötigten Menge, so daß also keine überschüssigen Aminosäuren gebildet und ausgeschieden werden. Dies ist darin begründet, daß in der Zelle die Biosynthese der Aminosäuren in vielfacher Weise kontrolliert wird. Folglich sind bereits verschiedenste Verfahren bekannt, um die Produktbildung durch Ausschalten der Kontrollmechanismen zu steigern. Bei diesen Prozessen werden z.B. Aminosäureanaloga eingesetzt, um die effektive Regulation der Biosynthese auszuschalten. So ist beispielsweise ein Verfahren beschrieben, bei dem Corynebacterium-Stämme benutzt werden, die gegen L-Tyrosin- und L-Phenylalaninanaloga resistent sind (JP 19037/1976 und 39517/1978). Ebenso sind Verfahren beschrieben, bei denen gegenüber L-Lysin- oder auch L-Theoninanaloga resistente Bakterien eingesetzt werden, um die Kontrollmechanismen zu überwinden (EP 0 205 849, GB 2 152 509).

Weiterhin sind auch durch rekombinante DNA-Techniken konstruierte Mikroorganismen bekannt, bei denen ebenfalls die Regulation der Biosynthese aufgehoben ist, indem die Gene, die für die nicht mehr feedback-inhibierbaren Schlüsselenzyme kodieren, kloniert und exprimiert werden. So ist z.B. ein rekombinantes, L-Lysin produzierendes Bakterium mit plasmid-kodierter, feedback-resistenter Aspartatkinase bekannt (EP 0 381 527). Ebenso ist ein rekombinantes, L-Phenylalanin produzierendes Bakterium mit feedback-resistenter Prephenatdehydrogenase beschrieben (JP 123475/1986, EP 0 488 424).

25

Darüber hinaus wurden auch durch Überexpression von Genen, die nicht für feedback-sensitive Enzyme der Aminosäuresynthese kodieren, erhöhte Aminosäureausbeuten erreicht. So wird z.B. die Lysinbildung durch erhöhte Synthese

30

der Dihydrodipicolinatsynthese verbessert (EP 0 197 335). Ebenso wird durch erhöhte Synthese der Threonindehydratase eine verbesserte Isoleucinbildung erreicht (EP 0 436 886).

Weitere Versuche zur Erhöhung der Aminosäureproduktion zielen auf eine verbesserte Bereitstellung der zellulären Primärmetabolite des Zentralstoffwechsels. So ist bekannt, daß die durch rekombinante Techniken erreichte Überexpression der Transketolase eine verbesserte Produktbildung von L-Tryptophan, L-Tyrosin oder L-Phenylalanin ermöglicht (EP 0 600 463). Weiterhin führt die Reduktion der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivität in *Corynebacterium* zu verbesserter Bildung aromatischer Aminosäuren (EP 0 3331 145), wohingegen die Erhöhung der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivität in *Corynebacterium* zu erhöhter Ausscheidung von Aminosäuren der Aspartatfamilie führte (EP 0 358 940).

Während des Wachstums und speziell unter Aminosäureproduktionsbedingungen muß der Tricarbonsäure-Cyclus kontinuierlich und effektiv mit C4-Verbindungen, z.B. Oxalacetat, aufgefüllt werden, um die für die Aminosäurebiosynthese abgezogenen Zwischenprodukte zu ersetzen. Bis vor kurzem hat man angenommen, daß für diese sogenannten anaplerotischen Funktionen in *Corynebacterium* die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase verantwortlich ist (Kinoshita, *Biology of industrial micro-organisms* 1985: 115 bis 142, Benjamin/Cummings Publishing Company, London; Liebl, *The prokaryotes II*, 1991: 1157 bis 1171, Springer Verlag N.Y.; Vallino und Stephanopoulos, *Biotechnol Bioeng* 1993, 41: 633 bis 646). Es wurde jedoch gefunden, daß Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-negative Mutanten im Vergleich zu den jeweiligen Ausgangsstämmen auf allen getesteten Medien gleich wuchsen (Peters-Wendisch et al., *FEMS Microbiology Letters* 1993, 112: 269 bis 274; Gubler et al., *Appl Microbiol Biotechnol* 1994, 40: 857 bis 863). Dieses

Ergebnis zeigte, daß die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase nicht essentiell für das Wachstum ist und für die anaplerotischen Reaktionen keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielt. Desweiteren wies das oben genannte Ergebnis darauf hin, daß es in *Corynebacterium* mindestens ein anderes Enzym geben muß, das für die Synthese von Oxalacetat, das für das Wachstum benötigt wird, verantwortlich ist. Kürzlich wurde auch tatsächlich eine Pyruvat-Carboxylase-Aktivität in permeabilisierten Zellen von *Corynebacterium glutamicum* gefunden (Peters-Wendisch et al., Microbiology 1997, 143: 1095 bis 1103). Dieses Enzym wird effektiv durch AMP, ADP und Acetyl-Coenzym A inhibiert und in Gegenwart von Laktat als Kohlenstoffquelle in erhöhter Menge gebildet. Da davon ausgegangen werden mußte, daß dieses Enzym in erster Linie für die Auffüllung des Tricarbonsäure-Cycluses beim Wachstum verantwortlich ist, war zu erwarten, daß eine Erhöhung der Genexpression bzw. der Enzymaktivität entweder zu keiner oder allenfalls zu einer geringfügigen Erhöhung der zur Aspartatfamilie gehörenden Aminosäuren führt. Desweiteren wurde erwartet, daß eine Erhöhung der Genexpression bzw. der Enzymaktivität der Pyruvat-Carboxylase ebenso keinen Einfluß auf die Produktion von Aminosäuren anderer Familien haben würde.

Es wurde nunmehr überraschenderweise gefunden, daß nach Erhöhung der Pyruvat-Carboxylase-Aktivität durch genetische Veränderung des Enzyms und / oder nach Erhöhung der Pyruvat-Carboxylase-Genexpression die mikrobielle Herstellung von Aminosäuren der Aspartat- und/oder der Glutamatfamilie erhöht wird. Es zeigte sich, daß insbesondere Stämme mit erhöhter Kopienzahl des Pyruvat-Carboxylase-Gens etwa 50% mehr Lysin, 40% mehr Threonin und 150% mehr Homoserin ins Kulturmedium ausscheiden.

Die genetische Veränderung der Pyruvat-Carboxylase zur Erhöhung der Enzymaktivität erfolgt vorzugsweise durch Mutation des endogenen Gens. Derartige

Mutationen können entweder nach klassischen Methoden ungerichtet erzeugt werden, wie beispielsweise durch UV-Bestrahlung oder durch mutationsauslösenden Chemikalien, oder gezielt mittels gentechnologischer Methoden wie Deletion(en), Insertion(en) und/oder Nukleotidaustausch(e).

Die Pyruvat-Carboxylase-Genexpression wird durch Erhöhen der Genkopienzahl und/oder durch Verstärkung regulatorischer Faktoren, die die Expression des Gens positiv beeinflussen, erhöht. So kann eine Verstärkung regulatorischer Elemente vorzugsweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem insbesondere die Transkriptionssignale erhöht werden. Dies kann beispielsweise dadurch erfolgen, daß durch Veränderung der dem Strukturgen vorgeschalteten Promotorsequenz der Promotor in seiner Wirksamkeit erhöht wird oder indem der Promotor komplett durch wirksamere Promotoren ausgetauscht wird. Auch kann eine Verstärkung der Transkription durch entsprechende Beeinflussung eines dem Pyruvat-Carboxylase-Gens zugeordneten Regulatorgens erfolgen. Desweiteren kann ggf durch Mutation einer regulatorischen Gensequenz die Effektivität der Bindung eines Regulatorproteins an die DNA des zu regulierenden Pyruvat-Carboxylase-Gens so beeinflusst sein, daß dadurch die Transkription verstärkt und somit die Genexpression erhöht ist. Desweiteren können dem Pyruvat-Carboxylase-Gen als regulatorische Sequenzen aber auch sog. „enhancer“ zugeordnet sein, die über eine verbesserte Wechselwirkung zwischen RNA-Polymerase und DNA ebenfalls eine erhöhte Pyruvat-Carboxylase-Genexpression bewirken. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der m-RNA verbessert wird.

Zur Erhöhung der Genkopienzahl wird das Pyruvat-Carboxylase-Gen in ein Genkonstrukt bzw. Vektor eingebaut. Das Genkonstrukt enthält insbesondere dem



Pyruvat-Carboxylase-Gen zugeordnete regulatorische Sequenzen, vorzugsweise solche, die die Genexpression verstärken. Für den Einbau des Pyruvat-Carboxylase-

5 Gens in ein Genkonstrukt wird das Gen vorzugsweise aus einem Mikroorganismen-Stamm der Gattung *Corynebacterium* isoliert und in einen Aminosäure-produzierenden Mikroorganismen-Stamm, insbesondere *Corynebacterium* oder in *Escherichia coli* oder *Serratia marcescens*, transformiert. Für das erfindungsgemäße Verfahren eignen sich insbesondere Gene aus *C. glutamicum* oder *C. glutamicum* ssp.

10 *flavum* oder *C. glutamicum* ssp. *lactofermentum*. Nach Isolierung des Gens und der in vitro-Rekombination mit bekannten Vektoren (vgl. z.B. Simon et al., *Bio/Technology* 1983, 1: 784 bis 791; Eikmanns et al., *Gene* 1991, 102: 93 bis 98) erfolgt die Transformation in die Aminosäure-produzierenden Stämme durch Elektroporation (Liebl et al., *FEMS Microbiology Letters* 1991, 65: 299 bis 304) oder Konjugation

15 (Schäfer et al., *J Bacteriol* 1990, 172: 1663 bis 1666). Als Wirtsstämme werden vorzugsweise solche Aminosäureproduzenten eingesetzt, die in der Synthese der entsprechenden Aminosäure dereguliert sind und/oder die eine erhöhte Exportcarrier-Aktivität für die entsprechende Aminosäure aufweisen. Weiterhin werden solche Stämme bevorzugt, die einen erhöhten Anteil an solchen

20 Zentralstoffwechselmetaboliten enthalten, die an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligt sind und / oder Stämme, die einen erniedrigten Anteil an den nicht an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligten Zentralstoffwechselmetaboliten enthalten, insbesondere an Metaboliten, die für Konkurrenzreaktionen zuständig sind; d.h. es werden solche Stämme bevorzugt, bei

25 denen ein zu dem entsprechenden Aminosäurebiosyntheseweg konkurrierender Biosyntheseweg mit verminderter Aktivität abläuft. So ist insbesondere ein, gegen L-Asparaginsäure- $\beta$ -Methylester (AME) resistenter coryneformer Mikroorganismen-Stamm mit reduzierter Citrat-Synthase-Aktivität geeignet (EP 0 551 614).

- Nach Isolierung sind Pyruvat-Carboxylase-Gene mit Nukleotidsequenzen erhältlich, die für die unter SEQ ID No. 2 angegebenen Aminosäuresequenz oder deren Allelvariationen kodieren bzw. die die Nukleotidsequenz von Nukleotid 165 bis 3587 gemäß SEQ ID No. 1 oder einer im wesentlichen gleichwirkenden DNA-Sequenz aufweisen. Desweiteren sind Gene mit einem vorgeschalteten Promotor der Nukleotidsequenz von Nukleotid 20 bis 109 gemäß SEQ ID No. 1 oder eine im wesentlichen gleichwirkende DNA-Sequenz erhältlich. Allelvariationen bzw. gleichwirkende DNA-Sequenzen umfassen insbesondere funktionelle Derivate, die durch Deletion(en), Insertion(en) und/oder Substitution(en) von Nukleotiden aus entsprechenden Sequenzen erhältlich sind, wobei die Enzymaktivität bzw. -funktion erhalten bleibt oder sogar erhöht ist. Diese Pyruvat-Carboxylase-Gene werden vorzugsweise im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt.
- Dem Pyruvat-Carboxylase-Gen mit oder ohne vorgeschaltetem Promotor bzw. mit oder ohne zugeordnetem Regulatorgen können ein oder mehrere DNA-Sequenzen vor- und/oder nachgeschaltet sein, so daß das Gen in einer Genstruktur enthalten ist.
- Dem Pyruvat-Carboxylase-Gen ist vorzugsweise der tac-Promotor ( $\text{lacI}^Q$ -Gen) vorgeschaltet, wobei diesem insbesondere regulatorische Sequenzen zugeordnet sind.
- Durch Klonierung des Pyruvat-Carboxylase-Gens sind Plasmide erhältlich, die das Gen enthalten und zur Transformation eines Aminosäureproduzenten geeignet sind.
- Die durch Transformation erhältlichen Zellen, bei denen es sich vorzugsweise um transformierte Zellen von *Corynebacterium* handelt, enthalten das Gen in replizierbarer Form, d.h. in zusätzlichen Kopien auf dem Chromosom, wobei die Genkopien durch Rekombination an beliebigen Stellen des Genoms integriert werden, und/oder auf einem Plasmid oder Vektor.

## Ausführungsbeispiel

### 5 1. Klonierung des Pyruvat-Carboxylase-Gens aus *Corynebacterium glutamicum*

Ausgehend von konservierten Bereichen aller bisher bekannten Pyruvat-Carboxylase-(pyc-)Genen, von *Saccharomyces cerevisiae* (J Biol Chem 1988, 263: 11493-11497; Mol Gen Genet 1991, 229: 307-315), Mensch (Biochim Biophys Acta 1994, 1227: 46-52), Maus (Proc Natl Acad Sci, USA 1993, 90: 1766-1770), *Aedes aegypti* (EMBL-GenBank: Accession Nr. L36530) sowie von *Mycobacterium tuberculosis* (EMBL-GenBank: Accession Nr. U00024) wurden PCR-Primer synthetisiert (MWG Biotech). Die Primer entsprachen den Basen 810 bis 831 und 1015 bis 1037 des pyc-Gens von *M. tuberculosis*. Mit diesen Primern konnte mittels PCR nach der Standardmethode von Innis et al. (PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press) für nicht-degenerierte, homologe Primer ein Fragment von ca. 200 bp aus chromosomaler DNA von *C. glutamicum* ATCC 13032, die wie bei Eikmanns et al. (Microbiology 1994, 140: 1817-1828) beschrieben, isoliert wurde, amplifiziert werden. Die Größe von 200 bp entsprach der Erwartung für pyc-Gene. Das PCR-Produkt wurde wie bei Sanger et al. (Proc Natl Acad Sci USA 1977, 74: 5463-5467) beschrieben, sequenziert. Die Sequenzierung wurde mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs mit einer automatischen DNA-Sequenzierapparatur (Applied Biosystems) durchgeführt.

25

Ausgehend von diesem DNA-Fragment aus *C. glutamicum* wurden folgende homologe Oligonukleotide hergestellt:

pyc 1	5'-	CGTCTTCATCGAAATGAAC -3'
pyc 2	5'-	ACGGTGGTGATCCGGCACT -3'

30

Die Oligonukleotide wurden als PCR-Primer zur Isolierung einer Sonde für das Gen der Pyruvat-Carboxylase (pyc) aus *C. glutamicum* verwendet. Die Primer wurden in eine PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA von *C. glutamicum* und Digoxigeninmarkierten Nukleotiden eingesetzt. Die Reaktion wurde nach der Vorschrift des 'PCR DIG Labeling Kits' der Firma Boehringer Mannheim durchgeführt. Mit diesem Ansatz konnte ein Digoxigenin-markiertes DNA-Fragment amplifiziert werden, das der erwarteten Größe von ca. 200 bp entsprach. Die so hergestellte pyc-Sonde wurde dann eingesetzt, um über Southern-Blot-Hybridisierung ein DNA-Fragment in der chromosomalen DNA von *C. glutamicum* zu identifizieren, auf dem das pyc-Gen lokalisiert ist. Hierzu wurden jeweils 2 bis 5 µg chromosomaler DNA von *C. glutamicum* WT mit den Restriktionsenzymen HindIII, SphI, SalI, DraI, EcoRI und BamHI geschnitten, die erhaltenen DNA-Fragmente 16 h bei 20 V in einem 0,8 %igen Agarosegel gelelektrophoretisch ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Die in dem Agarosegel befindlichen DNA-Fragmente wurden nach einer Methode von Southern (J Mol Biol 1975, 98: 503-517) denaturiert und vakuumunterstützt mit der VacuGene Blot Apparatur von Pharmacia LKB (Uppsala, Schweden) aus der Gelmatrix auf eine Nylon-Membran (Nytran N13 von Schleicher und Schüll, Dassel, Schweiz) transferiert, immobilisiert und die Digoxigeninmarkierung mittels NBT/X-Phosphat-Umsetzung durch alkalische Phosphatase nachgewiesen. Auf diese Weise konnten folgende, mit der pyc-DNA-Sonde hybridisierende chromosomale Fragmente nachgewiesen werden: ein 17 kb HindIII-Fragment, ein 6,5 kb SalI-Fragment und ein 1,35 kb EcoRI-Fragment.

25

Das 17 kb HindIII-Fragment wurde isoliert und subkloniert. Dazu wurde eine Cosmid-Genbank aus chromosomaler DNA von *C. glutamicum* im Cosmid pH79 verwendet, die das Genom von *C. glutamicum* zu 99% repräsentierte (Mol Microbiol 1992, 6: 317-326). Der *E. coli*-Stamm DH5α wurde mit dieser Genbank mittels der

30

CaCl<sub>2</sub>-Methode von Sambrook et al. (Molecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) transformiert und zu ca. 300 Kolonien pro LB-Agarplatte mit 50 µg/l Kanamycin ausplattiert (insgesamt 5000 Kolonien). Anschließend wurden die erhaltenen Transformanten auf Nytran N13-Filter übertragen und diese zur alkalischen Lyse der Zellen und Denaturierung der DNA auf mit 0,5 M NaOH und 1,5 M NaCl getränktem Whatmann-Papier 5 min. inkubiert. Die darauffolgende Neutralisierung erfolgte mit 1 M Tris/HCl pH 7,5 und 1,5 M NaCl.

10 Nach Inkubation der Filter in 2 x SSC wurde die freigesetzte DNA durch UV-Bestrahlung bei 366 nm auf dem Filter fixiert. Anschließend wurden die restlichen Zelltrümmer durch Schütteln in 3 x SSC, 0,1 % SDS bei 50°C entfernt. Die Filter wurden in dieser Form für die Hybridisierung mit einer spezifischen pyc-Sonde, wie bei Southern (J Mol Biol 1975, 98: 503-517) beschrieben, verwendet. Es wurden 3

15 Transformanten identifiziert, die gegen die pyc-Sonde hybridisierten. Aus diesen Transformanten wurde die Cosmid-DNA mittels Plasmid-Präparation nach der Methode der alkalischen Lyse von Birnboim (Meth Enzymol 1983, 100: 243-255) isoliert und anschließend über Restriktion und Southern-Blot Analyse auf das Vorhandensein des HindIII-Fragments getestet. Das Cosmid pHC79-10, das ein 40 kb

20 Insert enthielt, trug das 17 kb HindIII-Fragment vollständig und wurde weiter analysiert. Es zeigte sich, daß auch nach Restriktion mit den Endonukleasen SalI und EcoRI die gleichen hybridisierenden Fragmente wie in der chromosomalen DNA, d.h. ein 6,5 kb SalI- und ein 1,35 kb EcoRI-Fragment, erhalten wurden. Das 17 kb HindIII-Fragment wurde durch Restriktion mit HindIII aus dem Cosmid isoliert und in den E.

25 coli-Vektor pUC18, der ebenfalls mit HindIII geschnitten wurde, ligiert. Es wurde eine Restriktionsanalyse des Fragments in dem resultierenden Vektor pUCpyc erstellt. Die physikalische Kartierung des Fragments ist in Figur 1 dargestellt.

## 2. Sequenzierung des Pyruvat-Carboxylase-Gens

5 In weiteren Subklonierungsschritten wurden ein 0,85 kb Sall-EcoRI-Fragment, das  
1,35 kb EcoRI-Fragment, ein 1,6 kb EcoRI-EcoRI-StuI-Fragment sowie ein 1,6 kb  
ClaI-Fragment, das partiell mit dem 0,85 kb Sall-EcoRI-Fragment überlappte, durch  
Restriktion mit den entsprechenden Restriktionsenzymen aus dem Plasmid pUCpyc  
isoliert. Durch Ligation wurden die Fragmente in den jeweils entsprechend  
10 restringierten Vektor pUC18 kloniert und anschließend nach Sanger et al. (Proc Natl  
Acad Sci USA 1977, 74: 5463-5467) wie oben beschrieben sequenziert. Die  
erhaltenen Nukleotidsequenzen wurden mit dem Programmpaket HUSAR (Release  
3.0) des Deutschen Krebsforschungszentrums (Heidelberg) analysiert. Die  
Sequenzanalyse der Fragmente ergab ein durchgehendes offenes Leseraster von 3576  
15 bp, das für eine Proteinsequenz von 1140 Aminosäuren kodiert. Ein Vergleich der  
abgeleiteten Proteinsequenz mit der EMBL Gen-Datenbank (Heidelberg) ergab  
Ähnlichkeiten zu allen bekannten Pyruvat-Carboxylasen. Die höchste Identität (62%)  
wurde zur putativen Pyruvat-Carboxylase aus *Mycobacterium tuberculosis* (EMBL-  
GenBank: Accession Nr. U00024) gefunden. Die Ähnlichkeit betrug, unter  
20 Berücksichtigung konservierter Aminosäureaustausche, 76%. Ein Vergleich mit den  
Pyruvat-Carboxylasen anderer Organismen ergab 46 bis 47% identische und 64 bis  
65% ähnliche Aminosäuren (Gene 1997, 191: 47-50; J Bacteriol 1996, 178: 5960-  
5970; Proc Natl Acad Sci USA 1993, 90: 1766-1770; Biochem J 1996, 316: 631-637;  
EMBL-GenBank: Accession Nr. L36530; J Biol Chem 1988, 263: 11493-11497; Mol  
25 Gen Genet 1991, 229: 307-315). Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, daß das  
klonierte Fragment das Gen für die Pyruvat-Carboxylase aus *C. glutamicum* trägt. Die  
Nukleotidsequenz des Gens ist unter SEQ ID No.1 und die entsprechende  
Aminosäuresequenz unter SEQ ID No. 2 angegeben.

### 3. Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens

5 Zur Überexpression des Gens für die Pyruvat-Carboxylase aus *C. glutamicum* wurde das Gen aus dem Plasmid pUCpyc als 6,2 kb SspI-ScaI-Fragment in den *E. coli*-*C. Glutamicum*-Pendelvektor pEK0 (Gene 1991, 102: 93-98) kloniert, der mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und PstI geschnitten wurde. Mittels Klenow-Polymerase-Behandlung wurden die überhängenden Enden zu glatten Enden  
10 aufgefüllt (EcoRI) bzw. abgedaut (PstI), und der linearisierte Vektor wurde mit dem 6,2 kb SspI-ScaI-Fragment ligiert. Das erhaltene Konstrukt pEK0pyc wurde zunächst in den Stamm *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert, die Plasmid-DNA auf den erhaltenen Transformanten isoliert und auf die Richtigkeit des Inserts durch Restriktion kontrolliert. Die DNA wurde anschließend in den Stamm SP733 durch  
15 Elektroporation eingebracht (FEMS Microbiol Lett 1989, 65: 299-304). Bei diesem Stamm handelt es sich um eine Mutante des restriktionsnegativen *C. glutamicum* Stammes R127 (Dechema Biotechnology Conference 1990, 4: 323-327, Verlag Chemie), die durch chemische Mutagenese erhalten worden war und sich dadurch auszeichnet, daß sie nicht auf Minimalmedium mit Pyruvat und Lactat als einziger  
20 Kohlenstoffquelle wachsen kann (Microbiology 1997, 143: 1095-1103). Dieser Phänotyp wird durch einen Defekt in der Pyruvat-Carboxylase hervorgerufen und konnte durch das Einbringen des Pyruvat-Carboxylase-Gens aus *C. glutamicum* komplementiert werden, d.h. der Stamm, der das Plasmid pEK0pyc trägt, war im Gegensatz zum Ausgangsstamm wieder in der Lage auf Minimalmedium mit Lactat  
25 als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Damit war auch der Beweis erbracht, daß das Gen für eine funktionelle Pyruvat-Carboxylase kodiert.

Darüber hinaus wurde das Plasmid pEK0pyc in den *C. glutamicum* Wildtyp ATCC 13032 durch Elektroporation transformiert. Der resultierende Stamm WT (pEK0pyc)

wurde im Vergleich zum Wildtyp ATCC 13032 bezüglich seiner Pyruvat-Carboxylase-Aktivität untersucht. Die Stämme wurden in Komplexmedium (Luria-Bertani, Molecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) mit 0,5 % Lactat und auf Minimalmedium mit 2 % Lactat bzw. 4 % Glukose gezüchtet, und der Pyruvat-Carboxylase-Test wurde entsprechend der Methode, wie sie bei Peters-Wendisch et al. (Microbiology 1997, 143: 1095-1103) beschrieben wurde, durchgeführt. Das Ergebnis der Analyse (Tabelle 1) zeigt, daß die Pyruvat-Carboxylase-Aktivität im pEK0-pyc-tragenden Stamm ca. 4-fach höher als im Ausgangsstamm war.

#### 4. Gesteigerte Akkumulation von Lysin durch Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens im Stamm *C. glutamicum* DG52-5

Zur Untersuchung der Auswirkung der Überexpression des Gens für die Pyruvat-Carboxylase in dem Lysin-Produktionsstamm DG52-5 (J Gen Microbiol 1988, 134: 3221-3229) wurde der Expressionsvektor pVWEX1 verwendet, der eine IPTG-induzierbare Expression erlaubt. In diesen Vektor wurde das pyc Gen promotorlos hinein kloniert. Dazu wurden zunächst PCR-Primer (Primer 1 = Position 112 - 133; Primer 2 = Position 373 bis 355 in der Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID No. 1) synthetisiert und 261 bp des promotorlosen Anfangsbereichs des Pyruvat-Carboxylase-Gens mittels PCR amplifiziert. Die Primer wurden so gewählt, daß Primer 1 eine PstI-Schnittstelle vermittelt und Primer 2 eine BamHI-Schnittstelle. Nach der PCR wurde das erhaltene 274 bp PCR-Produkt isoliert, zu Konkaternen ligiert und anschließend mit den Restriktionsenzymen PstI und BamHI geschnitten. Der Restriktionsansatz wurde durch Ethanol-Fällung ankonzentriert und anschließend mit dem PstI-BamHI-geschnittenen Vektor pVWEX1 ligiert. Das erhaltene Konstrukt



pVWEX1-PCR wurde durch Restriktion getestet. Der Endbereich des pyc Gens wurde durch RcaI-Klenow-SalI-Behandlung aus dem Vektor pEK0pyc isoliert und in den BamHI-Klenow-SalI behandelten Vektor pVWEX1-PCR ligiert. Das erhaltene  
 5 Konstrukt pVWEX1pyc wurde durch Restriktionskartierung analysiert. Eine physikalische Karte des Plasmids ist in Figur 2 gezeigt.

Das Plasmid wurde durch Elektroporation in den *C. glutamicum* Stamm DG52-5  
 10 eingebracht. Als Kontrolle wurde der Stamm DG52-5 mit dem Vektor pVWEX1 ohne Insert transformiert und die L-Lysinausscheidung jeweils drei verschiedener Transformanten verglichen. Dazu wurden DG52-5(pVWEX1)1, 2 und 3 sowie DG52-5(pVWEX1pyc)3, 4 und 6 in Komplexmedium (2xTY; Molecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press; mit 50 µg/l  
 15 Kanamycin) gezüchtet und das Fermentationsmedium CGXII (J Bacteriol 1993, 175: 5595-5603) jeweils aus den Vorkulturen getrennt beimpft. Das Medium enthielt zusätzlich Kanamycin, um die Plasmide stabil zu halten. Es wurden jeweils zwei parallele Ansätze durchgeführt, wobei einem Kolben 200 µg IPTG/ml zugesetzt wurde, während der zweite Kolben kein IPTG enthielt. Nach Kultivierung für 48  
 20 Stunden bei 30°C auf dem Rotationsschüttler bei 120 Upm wurde die in das Medium akkumulierte Lysinmenge bestimmt. Die Bestimmung der Aminosäurekonzentration erfolgte mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (J Chromat 1983, 266: 471-482). Das Ergebnis der Fermentation ist in Tabelle 2 dargestellt, wobei die angegebenen Werte Mittelwerte aus jeweils drei Experimenten mit unterschiedlichen  
 25 Klonen darstellen. Es zeigte sich, daß die Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens zu einer um 50 % gesteigerten Akkumulation von Lysin im Medium führt. Somit stellt die Nutzung des entdeckten und beschriebenen Gens für das anaplerotische Enzym Pyruvat-Carboxylase ein Verfahren dar, um die L-Lysinbildung entscheidend zu verbessern.

**5. Gesteigerte Akkumulation von Threonin und Homoserin durch Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens im Stamm *C. glutamicum* DM368-3**

Analog zu den Experimenten zur L-Lysin-Bildung wurde auch die Akkumulation von Threonin im Kulturüberstand durch Überexpression des Gens für die Pyruvat-Carboxylase untersucht. Hierzu wurde, wie unter Punkt 4 beschrieben, der Threoninproduktionsstamm *C. glutamicum* DM368-3 (Degussa AG) mit dem Plasmid pVWEX1pyc sowie zur Kontrolle mit dem Plasmid pVWEX1 transformiert und die Threoninausscheidung von jeweils drei verschiedenen Transformanten untersucht. Dazu wurden DM368-3(pVWEX1)1, 2 und 3 sowie DM368-3(pVWEX1pyc)1, 2 und 3 in Komplexmedium (2xTY mit 50 µg/l Kanamycin) gezüchtet und das Fermentationsmedium CGXII (J Bacteriol 1993, 175: 5595-5603) jeweils aus den Vorkulturen getrennt beimpft. Das Medium enthielt zusätzlich Kanamycin, um die Plasmide stabil zu halten. Es wurden zwei parallele Ansätze durchgeführt, wobei einem Kolben 200 µ IPTG/ml zugesetzt wurde, während der zweite Kolben kein IPTG enthielt. Nach Kultivierung für 48 Stunden bei 30°C auf dem Rotationsschüttler bei 120 Upm wurde die in das Medium akkumulierte Threoninmenge bestimmt. Die Bestimmung der Aminosäurekonzentration erfolgte ebenfalls mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (J Chromat 1983, 266: 471-482). Das Ergebnis der Fermentation ist in Tabelle 3 dargestellt, wobei die angegebenen Werte Mittelwerte aus jeweils drei Experimenten mit unterschiedlichen Klonen darstellen. Es zeigte sich, daß die Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens zu einer ca. 40%igen Steigerung der Threoninkonzentration im Medium führt. Somit stellt die Nutzung des entdeckten und beschriebenen Gens für das anaplerotische Enzym Pyruvat-Carboxylase ein Verfahren dar, um die L-Threoninbildung entscheidend zu verbessern.

Desweiteren zeigte die Aminosäurekonzentrationsbestimmung, daß  
überraschenderweise der Stamm mit überexprimiertem Pyruvat-Carboxylase-Gen  
5 außerdem etwa 150% mehr Homoserin ins Medium ausschied als der Stamm mit nicht  
überexprimiertem Gen. Die entsprechenden Ergebnisse sind ebenfalls in Tabelle 3  
dargestellt. Sie machen deutlich, daß durch das erfindungsgemäße Verfahren sowohl  
die Threonin- als auch die Homoserinbildung entscheidend verbessert werden kann.

5

## Patentansprüche

- 10 1. Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren der Aspartat- und/oder Glutamatfamilie, bei dem die Pyruvat-Carboxylase-Aktivität durch genetische Veränderung des Enzyms und / oder die Pyruvat-Carboxylase-Genexpression eines die entsprechende Aminosäure produzierenden Mikroorganismus erhöht wird.
- 15 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß durch Mutation des endogenen Pyruvat-Carboxylase-Gens ein Enzym mit höherer Pyruvat-Carboxylase-Aktivität erzeugt wird.
- 20 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Genexpression der Pyruvat-Carboxylase durch Erhöhen der Genkopienzahl erhöht wird.
- 25 4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß zur Erhöhung der Genkopienzahl das Pyruvat-Carboxylase-Gen in ein Genkonstrukt eingebaut wird.

30

5. Verfahren nach Anspruch 4,  
dadurch gekennzeichnet,  
5 daß das Gen in ein Genkonstrukt eingebaut wird, das dem Pyruvat-  
Carboxylase-Gen zugeordnete regulatorische Gensequenzen enthält.
6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5,  
dadurch gekennzeichnet,  
10 daß ein die entsprechende Aminosäure produzierender Mikroorganismus  
mit dem das Gen enthaltende Genkonstrukt transformiert wird.
7. Verfahren nach Anspruch 6,  
dadurch gekennzeichnet,  
15 daß ein Mikroorganismus der Gattung *Corynebacterium* mit dem das Gen  
enthaltende Genkonstrukt transformiert wird.
8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7,  
dadurch gekennzeichnet,  
20 daß für die Transformation ein Mikroorganismus eingesetzt wird, in dem die  
an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligten Enzyme  
dereguliert sind und / oder die eine erhöhte Exportcarrier-Aktivität für die  
entsprechende Aminosäure aufweisen.
- 25 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß für die Transformation ein Mikroorganismus eingesetzt wird, der einen  
erhöhten Anteil an den an der Synthese der entsprechenden Aminosäure  
beteiligten Zentralstoffwechselmetaboliten enthält.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 9,  
dadurch gekennzeichnet,  
5 daß für die Transformation ein Mikroorganismus eingesetzt wird, bei dem ein  
zu dem entsprechenden Aminosäurebiosyntheseweg konkurrierender Biosyn-  
theseweg mit verminderter Aktivität abläuft.
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
10 dadurch gekennzeichnet,  
daß das Pyruvat-Carboxylase-Gen aus einem Mikroorganismus-Stamm der  
Gattung Corynebacterium isoliert wird.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
15 dadurch gekennzeichnet,  
daß die Genexpression durch Verstärkung der Transkriptionssignale erhöht  
wird.
13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
20 dadurch gekennzeichnet,  
daß dem Pyruvat-Carboxylase-Gen der tac-Promotor vorgeschaltet wird.
14. Verfahren nach Anspruch 13,  
gekennzeichnet durch  
25 dem tac-Promotor zugeordnete regulatorische Sequenzen.
15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß als Pyruvat-Carboxylase-Gen ein Gen mit einer für die unter SEQ ID  
30 No. 2 angegebenen Aminosäuresequenz und deren Allelvariationen

kodierenden Nukleotidsequenz eingesetzt wird.

- 5      16. Verfahren nach Anspruch 15,  
         d a d u r c h   g e k e n n z e i c h n e t ,  
         daß als Pyruvat-Carboxylase-Gen ein Gen mit der Nukleotidsequenz von  
         Nukleotid 165 bis 3587 gemäß SEQ ID No. 1 oder einer im wesentlichen  
         gleichwirkenden DNA-Sequenz eingesetzt wird.
- 10
17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Herstellung von  
         Lysin, Threonin, Homoserin, Glutamat und/oder Arginin.
- 15      18. Pyruvat-Carboxylase-Gen mit einer für die unter SEQ ID No. 2  
         angegebenen Aminosäuresequenz und / oder deren Allelvariationen  
         kodierenden Nukleotidsequenz.
- 20      19. Pyruvat-Carboxylase-Gen nach Anspruch 18 mit der Nukleotidsequenz von  
         Nukleotid 165 bis 3587 gemäß SEQ ID Nr. 1 oder einer im wesentlichen  
         gleichwirkenden DNA-Sequenz.
- 25      20. Pyruvat-Carboxylase-Gen nach Anspruch 18 oder 19 mit einem  
         vorgeschalteten Promotor der Nukleotidsequenz von Nukleotid 20 bis 109  
         gemäß SEQ ID No. 1 oder einer im wesentlichen gleichwirkenden DNA-  
         Sequenz.
- 30      21. Pyruvat-Carboxylase-Gen nach Anspruch 18 oder 19 mit vorgeschaltetem  
         tac-Promotor

22. Pyruvat-Carboxylase-Gen nach Anspruch 21 mit dem Promotor zugeordneten regulatorischen Sequenzen.
- 5
23. Pyruvat-Carboxylase-Gen nach einem der Ansprüche 18 bis 20 mit diesem zugeordnete regulatorische Gensequenzen.
24. Genstruktur, enthaltend ein Pyruvat-Carboxylase-Gen nach einem der Ansprüche 18 bis 23.
- 10
25. Vektor, enthaltend ein Pyruvat-Carboxylase-Gen nach einem der Ansprüche 18 bis 23 oder eine Genstruktur nach Anspruch 24.
- 15
26. Transformierte Zelle, enthaltend in replizierbarer Form ein Pyruvat-Carboxylase-Gen nach einem der Ansprüche 18 bis 23 oder eine Genstruktur nach Anspruch 24.
27. Transformierte Zelle nach Anspruch 26, enthaltend einen Vektor nach Anspruch 25.
- 20
28. Transformierte Zelle nach Anspruch 26 oder 27,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß sie der Gattung *Corynebacterium* angehört.
- 25
29. Transformierte Zelle nach einem der Ansprüche 26 bis 28,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß in dieser die an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligten Enzyme und / oder die am Export der entsprechenden Aminosäure beteiligten Enzyme dereguliert sind.
- 30



30. Transformierte Zelle nach einem der Ansprüche 26 bis 29,  
dadurch gekennzeichnet,  
5 daß sie einen erhöhten Anteil an den an der Synthese der entsprechenden  
Aminosäure beteiligten Zentralstoffwechselmetaboliten enthält.
31. Transformierte Zelle nach einem der Ansprüche 26 bis 30,  
dadurch gekennzeichnet,  
10 daß sie einen erniedrigten Anteil an den nicht an der Synthese der  
entsprechenden Aminosäure beteiligten Zentralstoffwechselmetaboliten  
enthält.
32. Verwendung eines Pyruvat-Carboxylase-Gens zur Steigerung der  
15 Produktion von aus der Aspartat- und/oder Glutamatfamilie stammenden  
Aminosäuren von Mikroorganismen.
33. Verwendung nach Anspruch 32,  
dadurch gekennzeichnet,  
20 daß ein mutiertes Pyruvat-Carboxylase-Gen, das für ein Enzym mit erhöhter  
Pyruvat-Carboxylase-Aktivität kodiert, verwendet wird.
34. Verwendung nach Anspruch 32 oder 33,  
dadurch gekennzeichnet,  
25 daß der die entsprechende Aminosäure produzierende Mikroorganismus mit  
einem Genkonstrukt, das ein Pyruvat-Carboxylase-Gen enthält, transformiert  
wird.

35. Verwendung nach Anspruch 34,

dadurch gekennzeichnet,

5 daß das Genkonstrukt zusätzlich regulatorische Gensequenzen enthält.

36. Verwendung nach einem der Ansprüche 32 bis 35,

dadurch gekennzeichnet,

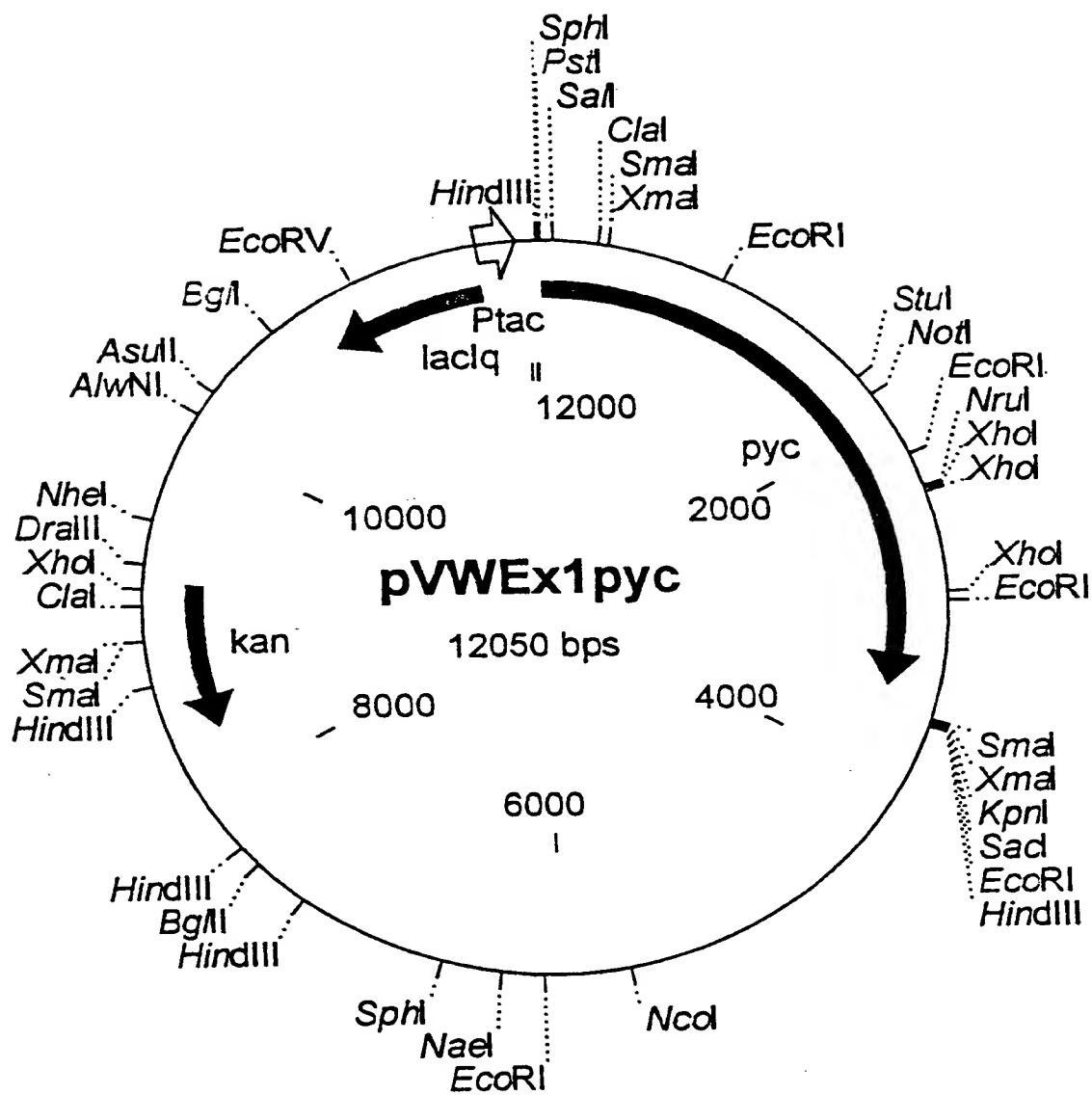
10 daß ein Pyruvat-Carboxylase-Gen aus Corynebacterium verwendet wird.

37. Verwendung nach einem der Ansprüche 32 bis 36,

dadurch gekennzeichnet,

15 daß als Aminosäure-produzierender Mikroorganismus Corynebacterium verwendet wird.





**Figur 2**

Stamm	IPTG [µg/ml]	Pyruvat-Carboxylase [nmol min <sup>-1</sup> mg Trockengewicht <sup>-1</sup> ]
13032(pEK0pyc)	0	75 ± 13
ATCC 13032	0	19 ± 4
DG52-5(pVWEX1pyc)	200	88 ± 13
	0	11 ± 2
DG52-5(pVWEX1)	200	5 ± 2
	0	6 ± 1
DM368-3(pVWEX1pyc)	200	76 ± 10
	0	12 ± 3
DM368-3(pVWEX1)	200	10 ± 1
	0	11 ± 2

**Tabelle 1**

Stamm	IPTG [µg/ml]	Lysin [mM]
DG52-5(pVWEX1pyc)	200	35,4 ± 2,6
	0	23,6 ± 2,9
DG52-5(pVWEX1)	200	23,3 ± 2,9
	0	22,1 ± 4,0

**Tabelle 2**

Stamm	IPTG [µg/ml]	Threonin [mM]	Homoserin [mM]
DM368-3(pVWEX1pyc)	200	10,2 ± 0,5	14,4 ± 1,2
	0	7,9 ± 1,0	5,6 ± 0,2
DM368-3(pVWEX1)	200	8,0 ± 0,5	5,8 ± 0,7
	0	7,5 ± 0,8	6,1 ± 1,0

**Tabelle 3**

# SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

### (i) ANMELDER:

- (A) NAME: Forschungszentrum Juelich GmbH
- (B) STRASSE: Postfach 1913
- (C) ORT: Juelich
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 52425

### (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Pyruvat Carboxylase

### (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

### (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

### (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 3728 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

### (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

### (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CGCAACCGTG CTTGAAGTCG TGCAGGTCAG GGGAGTGTTG CCCGAAAACA TTGAGAGGAA	60
AACAAAAACC GATGTTTGAT TGGGGGAATC GGGGGTTACG ATACTAGGAC GCAGTGACTG	120
CTATCACCTT TGGCGGTCTC TTGTTGAAAG GAATAATTAC TCTAGTGTCT ACTCACACAT	180
CTTCAACGCT TCCAGCATTC AAAAAGATCT TGGTAGCAAA CCGCGGCGAA ATCGCGGTCC	240
GTGCTTTCCG TGCAGCACTC GAAACCGGTG CAGCCACGGT AGCTATTTAC CCCCCTGAAG	300
ATCGGGGATC ATTCCACCGC TCTTTTGCTT CTGAAGCTGT CCGCATGGT ACCGAAGGCT	360
CACCAAGTCAA GGCCTACCTG GACATCGATG AAATTATCGG TGCAGCTAAA AAAGTTAAAG	420
CAGATGCCAT TTACCCGGGA TACGGCTTCC TGTCTGAAAA TGCCCAGCTT GCCCGCGAGT	480



GTGCGGAAAA CGGCATTACT TTTATTGGCC CAACCCCAGA GGTCTTGAT CTCACCGGTG	540
ATAAGTCTCG CGCGGTAACC GCCGGAAGA AGGCTGGTCT GCCAGTTTGG GCGGAATCCA	600
CCCCGAGCAA AAACATCGAT GAGATCGTTA AAAGCGCTGA AGGCCAGACT TACCCCATCT	660
TTGTGAAGGC AGTTGCCGGT GGTGGCGGAC GCGGTATGCG TTTTGTGCT TCACCTGATG	720
AGCTTCGCAA ATTAGCAACA GAAGCATCTC GTGAAGCTGA AGCGGCTTTC GCGGATGGCG	780
CGGTATATGT CGAACGTGCT GTGATTAACC CTCAGCATAT TGAAGTGCAG ATCCTTGCGC	840
ATCACACTGG AGAAGTTGTA CACCTTTATG AACGTGACTG CTCACTGCAG CGTCGTCACC	900
AAAAAGTTGT CGAAATTGCG CCAGCACAGC ATTTGGATCC AGAACTGCGT GATCGCATTT	960
GTGCGGATGC AGTAAAGTTC TGCCGCTCCA TTGGTTACCA GGGCGCGGGA ACCGTGGAAT	1020
TCTTGGTCGA TGAAAAGGGC AACCACGTCT TCATCGAAAT GAACCCACGT ATCCAGGTTG	1080
AGCACACCGT GACTGAAGAA GTCACCGAGG TGGACCTGGT GAAGGCGCAG ATGCGCTTGG	1140
CTGCTGGTGC AACCTTGAAG GAATTGGGTC TGACCCAAGA TAAGATCAAG ACCCACGGTG	1200
CAGCACTGCA GTGCCGCATC ACCACGGAAG ATCCAAACAA CGGCTTCCGC CCAGATACCG	1260
GAACTATCAC CGCGTACCGC TCACCAGGCG GAGCTGGCGT TCGTCTTGAC GGTGCAGCTC	1320
AGCTCGGTGG CGAAATCACC GCACACTTTG ACTCCATGCT GGTGAAAATG ACCTGCCGTG	1380
GTTCCGACTT TGAAACTGCT GTTGCTCGTG CACAGCGCGC GTTGGCTGAG TTCACCGTGT	1440
CTGGTGTGTC AACCAACATT GGTTCCTTGC GTGCGTTGCT GCGGGAAGAG GACTTCACTT	1500
CCAAGCGCAT CGCCACCGGA TTCATTGCCG ATCACCCGCA CCTCCTTCAG GCTCCACCTG	1560
CTGATGATGA GCAGGGACGC ATCCTGGATT ACTTGGCAGA TGTCACCGTG AACAAGCCTC	1620
ATGGTGTGCG TCCAAAGGAT GTTGCACTC CTATCGATAA GCTGCCTAAC ATCAAGGATC	1680
TGCCACTGCC ACGCGGTTCC CGTGACCGCC TGAAGCAGCT TGGCCCAGCC GCGTTTGCTC	1740
GTGATCTCCG TGAGCAGGAC GCACTGGCAG TTAAGTATAC CACCTTCCGC GATGCACACC	1800
AGTCTTTGCT TGCGACCCGA GTCCGCTCAT TCGCACTGAA GCCTGCGGCA GAGGCCGTCG	1860
CAAAGCTGAC TCCTGAGCTT TTGTCCGTGG AGGCCTGGGG CGGCGCGACC TACGATGTGG	1920
CGATGCGTTT CCTCTTTGAG GATCCGTGGG ACAGGCTCGA CGAGCTGCGC GAGGCGATGC	1980
CGAATGTAAA CATTGAGATG CTGCTTCGCG GCCGCAACAC CGTGGGATAC ACCCCGTACC	2040
CAGACTCCGT CTGCCGCGCG TTTGTAAAG AAGCTGCCAG CTCCGGCGTG GACATCTTCC	2100

GCATCTTCGA	CGCGCTTAAC	GACGTCTCCC	AGATGCGTCC	AGCAATCGAC	GCAGTCCTGG	2160
AGACCAACAC	CGCGGTAGCC	GAGGTGGCTA	TGGCTTATTC	TGGTGATCTC	TCTGATCCAA	2220
ATGAAAAGCT	CTACACCCCTG	GATTACTACC	TAAAGATGGC	AGAGGAGATC	GTCAAGTCTG	2280
GCGCTCACAT	CTTGGCCATT	AAGGATATGG	CTGGTCTGCT	TCGCCCAGCT	GCGGTAACCA	2340
AGCTGGTCAC	CGCACTGCGC	CGTGAATTCG	ATCTGCCAGT	GCACGTGCAC	ACCCACGACA	2400
CTGCGGGTGG	CCAGCTGGCA	ACCTACTTTG	CTGCAGCTCA	AGCTGGTGCA	GATGCTGTTG	2460
ACGGTGCTTC	CGCACCCTG	TCTGGCACCA	CCTCCCAGCC	ATCCCTGTCT	GCCATTGTTG	2520
CTGCATTTCG	GCACACCCGT	CGCGATACCG	GTTTGAGCCT	CGAGGCTGTT	TCTGACCTCG	2580
AGCCGTACTG	GGAAGCAGTG	CGCGGACTGT	ACCTGCCATT	TGAGTCTGGA	ACCCCAGGCC	2640
CAACCGGTTCG	CGTCTACCGC	CACGAAATCC	CAGGCGGACA	GTTGTCCAAC	CTGCGTGCAC	2700
AGGCCACCGC	ACTGGGCCTT	GCGGATCGTT	TCGAACTCAT	CGAAGACAAC	TACGCAGCCG	2760
TTAATGAGAT	GCTGGGACGC	CCAACCAAGG	TCACCCCATC	CTCCAAGGTT	GTTGGCGACC	2820
TCGCACTCCA	CCTCGTTGGT	GCGGGTGTGG	ATCCAGCAGA	CTTTGCTGCC	GATCCACAAA	2880
AGTACGACAT	CCCAGACTCT	GTCATCGCGT	TCCTGCGCGG	CGAGCTTGGT	AACCCTCCAG	2940
GTGGCTGGCC	AGAGCCACTG	CGCACCCGCG	CACTGGAAGG	CCGCTCCGAA	GGCAAGGCAC	3000
CTCTGACGGA	AGTTCCTGAG	GAAGAGCAGG	CGCACCTCGA	CGCTGATGAT	TCCAAGGAAC	3060
GTCGCAATAG	CCTCAACCGC	CTGCTGTTCC	CGAAGCCAAC	CGAAGAGTTC	CTCGAGCACC	3120
GTCGCCGCTT	CGGCAACACC	TCTGCGCTGG	ATGATCGTGA	ATTCTTCTAC	GGCCTGGTCG	3180
AAGGCCGCGA	GACTTTGATC	CGCCTGCCAG	ATGTGCGCAC	CCCACTGCTT	GTTGCGCTGG	3240
ATGCGATCTC	TGAGCCAGAC	GATAAGGGTA	TGCGCAATGT	TGTGGCCAAC	GTCAACGGCC	3300
AGATCCGCCC	AATGCGTGTG	CGTGACCGCT	CCGTTGAGTC	TGTCACCGCA	ACCGCAGAAA	3360
AGGCAGATTC	CTCCAACAAG	GGCCATGTTG	CTGCACCATT	CGCTGGTGTT	GTCACCGTGA	3420
CTGTTGCTGA	AGGTGATGAG	GTCAAGGCTG	GAGATGCAGT	CGCAATCATC	GAGGCTATGA	3480
AGATGGAAGC	AACAATCACT	GCTTCTGTTG	ACGGCAAAAT	CGATCGCGTT	GTGGTTCCTG	3540
CTGCAACGAA	GGTGGAAGGT	GGCGACTTGA	TCGTGTCGT	TTCTTAAACC	TTTCTGTAAA	3600
AAGCCCCGCG	TCTTCCTCAT	GGAGGAGGCG	GGGCTTTTTG	GGCCAAGATG	GGAGATGGGT	3660
GAGTTGGATT	TGGTCTGATT	CGACACTTTT	AAGGGCAGAG	ATTTGAAGAT	GGAGACCAAG	3720

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1140 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met	Ser	Thr	His	Thr	Ser	Ser	Thr	Leu	Pro	Ala	Phe	Lys	Lys	Ile	Leu	
1				5					10					15		
Val	Ala	Asn	Arg	Gly	Glu	Ile	Ala	Val	Arg	Ala	Phe	Arg	Ala	Ala	Leu	
			20					25					30			
Glu	Thr	Gly	Ala	Ala	Thr	Val	Ala	Ile	Tyr	Pro	Arg	Glu	Asp	Arg	Gly	
		35					40					45				
Ser	Phe	His	Arg	Ser	Phe	Ala	Ser	Glu	Ala	Val	Arg	Ile	Gly	Thr	Glu	
	50					55					60					
Gly	Ser	Pro	Val	Lys	Ala	Tyr	Leu	Asp	Ile	Asp	Glu	Ile	Ile	Gly	Ala	
65				70					75					80		
Ala	Lys	Lys	Val	Lys	Ala	Asp	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Tyr	Gly	Phe	Leu	
			85						90					95		
Ser	Glu	Asn	Ala	Gln	Leu	Ala	Arg	Glu	Cys	Ala	Glu	Asn	Gly	Ile	Thr	
		100						105					110			
Phe	Ile	Gly	Pro	Thr	Pro	Glu	Val	Leu	Asp	Leu	Thr	Gly	Asp	Lys	Ser	
		115					120					125				
Arg	Ala	Val	Thr	Ala	Ala	Lys	Lys	Ala	Gly	Leu	Pro	Val	Leu	Ala	Glu	
	130					135					140					
Ser	Thr	Pro	Ser	Lys	Asn	Ile	Asp	Glu	Ile	Val	Lys	Ser	Ala	Glu	Gly	
145				150						155					160	
Gln	Thr	Tyr	Pro	Ile	Phe	Val	Lys	Ala	Val	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Arg	
			165						170					175		
Gly	Met	Arg	Phe	Val	Ala	Ser	Pro	Asp	Glu	Leu	Arg	Lys	Leu	Ala	Thr	
		180						185					190			
Glu	Ala	Ser	Arg	Glu	Ala	Glu	Ala	Ala	Phe	Gly	Asp	Gly	Ala	Val	Tyr	

195					200					205					
Val	Glu	Arg	Ala	Val	Ile	Asn	Pro	Gln	His	Ile	Glu	Val	Gln	Ile	Leu
210					215					220					
Gly	Asp	His	Thr	Gly	Glu	Val	Val	His	Leu	Tyr	Glu	Arg	Asp	Cys	Ser
225					230					235					240
Leu	Gln	Arg	Arg	His	Gln	Lys	Val	Val	Glu	Ile	Ala	Pro	Ala	Gln	His
				245					250					255	
Leu	Asp	Pro	Glu	Leu	Arg	Asp	Arg	Ile	Cys	Ala	Asp	Ala	Val	Lys	Phe
			260					265					270		
Cys	Arg	Ser	Ile	Gly	Tyr	Gln	Gly	Ala	Gly	Thr	Val	Glu	Phe	Leu	Val
		275					280					285			
Asp	Glu	Lys	Gly	Asn	His	Val	Phe	Ile	Glu	Met	Asn	Pro	Arg	Ile	Gln
				290			295				300				
Val	Glu	His	Thr	Val	Thr	Glu	Glu	Val	Thr	Glu	Val	Asp	Leu	Val	Lys
305					310					315					320
Ala	Gln	Met	Arg	Leu	Ala	Ala	Gly	Ala	Thr	Leu	Lys	Glu	Leu	Gly	Leu
				325					330					335	
Thr	Gln	Asp	Lys	Ile	Lys	Thr	His	Gly	Ala	Ala	Leu	Gln	Cys	Arg	Ile
			340					345					350		
Thr	Thr	Glu	Asp	Pro	Asn	Asn	Gly	Phe	Arg	Pro	Asp	Thr	Gly	Thr	Ile
		355					360					365			
Thr	Ala	Tyr	Arg	Ser	Pro	Gly	Gly	Ala	Gly	Val	Arg	Leu	Asp	Gly	Ala
		370				375					380				
Ala	Gln	Leu	Gly	Gly	Glu	Ile	Thr	Ala	His	Phe	Asp	Ser	Met	Leu	Val
385					390					395					400
Lys	Met	Thr	Cys	Arg	Gly	Ser	Asp	Phe	Glu	Thr	Ala	Val	Ala	Arg	Ala
				405					410					415	
Gln	Arg	Ala	Leu	Ala	Glu	Phe	Thr	Val	Ser	Gly	Val	Ala	Thr	Asn	Ile
			420					425					430		
Gly	Phe	Leu	Arg	Ala	Leu	Leu	Arg	Glu	Glu	Asp	Phe	Thr	Ser	Lys	Arg
		435					440					445			
Ile	Ala	Thr	Gly	Phe	Ile	Ala	Asp	His	Pro	His	Leu	Leu	Gln	Ala	Pro
				450			455				460				
Pro	Ala	Asp	Asp	Glu	Gln	Gly	Arg	Ile	Leu	Asp	Tyr	Leu	Ala	Asp	Val
465					470					475				480	
Thr	Val	Asn	Lys	Pro	His	Gly	Val	Arg	Pro	Lys	Asp	Val	Ala	Ala	Pro

[illegible]

770	775	780
Val Ala Ala Phe Ala His Thr Arg Arg Asp Thr Gly Leu Ser Leu Glu		
785	790	795 800
Ala Val Ser Asp Leu Glu Pro Tyr Trp Glu Ala Val Arg Gly Leu Tyr		
	805	810 815
Leu Pro Phe Glu Ser Gly Thr Pro Gly Pro Thr Gly Arg Val Tyr Arg		
	820	825 830
His Glu Ile Pro Gly Gly Gln Leu Ser Asn Leu Arg Ala Gln Ala Thr		
	835	840 845
Ala Leu Gly Leu Ala Asp Arg Phe Glu Leu Ile Glu Asp Asn Tyr Ala		
	850	855 860
Ala Val Asn Glu Met Leu Gly Arg Pro Thr Lys Val Thr Pro Ser Ser		
	865	870 875 880
Lys Val Val Gly Asp Leu Ala Leu His Leu Val Gly Ala Gly Val Asp		
	885	890 895
Pro Ala Asp Phe Ala Ala Asp Pro Gln Lys Tyr Asp Ile Pro Asp Ser		
	900	905 910
Val Ile Ala Phe Leu Arg Gly Glu Leu Gly Asn Pro Pro Gly Gly Trp		
	915	920 925
Pro Glu Pro Leu Arg Thr Arg Ala Leu Glu Gly Arg Ser Glu Gly Lys		
	930	935 940
Ala Pro Leu Thr Glu Val Pro Glu Glu Glu Gln Ala His Leu Asp Ala		
	945	950 955 960
Asp Asp Ser Lys Glu Arg Arg Asn Ser Leu Asn Arg Leu Leu Phe Pro		
	965	970 975
Lys Pro Thr Glu Glu Phe Leu Glu His Arg Arg Arg Phe Gly Asn Thr		
	980	985 990
Ser Ala Leu Asp Asp Arg Glu Phe Phe Tyr Gly Leu Val Glu Gly Arg		
	995	1000 1005
Glu Thr Leu Ile Arg Leu Pro Asp Val Arg Thr Pro Leu Leu Val Arg		
	1010	1015 1020
Leu Asp Ala Ile Ser Glu Pro Asp Asp Lys Gly Met Arg Asn Val Val		
	1025	1030 1035 1040
Ala Asn Val Asn Gly Gln Ile Arg Pro Met Arg Val Arg Asp Arg Ser		
	1045	1050 1055
Val Glu Ser Val Thr Ala Thr Ala Glu Lys Ala Asp Ser Ser Asn Lys		

1060

1065

1070

Gly His Val Ala Ala Pro Phe Ala Gly Val Val Thr Val Thr Val Ala  
1075 1080 1085

Glu Gly Asp Glu Val Lys Ala Gly Asp Ala Val Ala Ile Ile Glu Ala  
1090 1095 1100

Met Lys Met Glu Ala Thr Ile Thr Ala Ser Val Asp Gly Lys Ile Asp  
1105 1110 1115 1120

Arg Val Val Val Pro Ala Ala Thr Lys Val Glu Gly Gly Asp Leu Ile  
1125 1130 1135

Val Val Val Ser  
1140

Forschungszentrum Jülich GmbH

5

„Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren der Aspartat- und/oder  
Glutamatfamilie und im Verfahren einsetzbare Mittel“

10

### **Zusammenfassung**

---

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von  
15 Aminosäuren der Aspartat- und/oder Glutamatfamilie, bei dem die Pyruvat-  
Carboxylase-Aktivität durch genetische Veränderung des Enzyms und/oder die  
Pyruvat-Carboxylase-Genexpression eines die entsprechende Aminosäure  
produzierenden Mikroorganismus erhöht wird. Desweiteren betrifft die vorliegende  
Erfindung ein Pyruvat-Carboxylase-Gen sowie weitere, im erfindungsgemäßen  
20 Verfahren einsetzbare Mittel.